

Année 1967

N° d'ordre : 471

THÈSES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean-Charles HENRY

PREMIERE THESE

**QUELQUES ASPECTS DU METABOLISME DE L'AORTE - INFLUENCES DE L'ADRENALINE
ET D'UN REGIME ATHEROGENE**

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 16 DEC. 1967, devant la Commission d'Examen.

MM. J. CHOPIN	Président
M ^{lle} D. GAUTHERON	} Examinateurs
MM. H. CLAUSER	

BESANCON

Imprimerie Faculté de Médecine
4 Place Saint-Jacques

1967

THÈSES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean-Charles HENRY

PREMIERE THESE

QUELQUES ASPECTS DU METABOLISME DE L'AORTE - INFLUENCES DE L'ADRENALINE
ET D'UN REGIME ATHEROGENE

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le

1967, devant la Commission d'Examen.

MM. J. CHOPIN	Président
M ^{lle} D. GAUTHERON	} Examinateurs
MM. H. CLAUSER	

BESANCON

Imprimerie Faculté de Médecine
4 Place Saint-Jacques

1967



Thèse préparée au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté
des Sciences de LYON, sous la direction de D. GAUTHERON, Professeur.

Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honoraires

MM. de LARAMBERGUE, SULLAUD, MOUSSA, JAFFARD, EYRAUD Henri,
DEJARDIN, VIRET, DUFAY Jean, AUMERAS.

Doyen

M. BRACONNIER

Assesseurs

MM. L. DAVID
BOLIDIN

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
PRETTRE	Chimie industrielle
COURTY	Chimie-Physique
KUHNER	Botanique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD	Physique industrielle
NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER Henri	Géologie générale
WAUTIER	Zoologie
CHUPIN	Chimie biologique
CUEILLERON	Chimie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
EYRAUD Charles	Chimie-Physique appliquée
SARAZIN	Physique nucléaire
BOLIDIN	Microbiologie et Mycologie

MM. PERES
MESNARD
GRANDMONTAGNE
BOUTILLIER
LAFOUCRIERE
DREUX
TEICHNER
PAVANS de CECCATTY
MERLIN
DUFAY Maurice
PHILBERT
COHEN-ADAD
DAVID Louis
CHANEL
MAURY
DEPAZ
GAUTHIER Jean
GAUME
UZAN
LEGAY
LAFORGUE
GERMAIN
CHENEVOY
BIGAY

Physiologie
Electronique
Physique
Minéralogie
Physique nucléaire théorique
Chimie organique
Chimie industrielle
Zoologie
Chimie Analytique
Physique de l'atmosphère
Physique nucléaire
Chimie
Géologie générale
Psychophysiologie
Méthodes mathématiques de la physique
Physique nucléaire
Chimie
Physique expérimentale
Physique
Biologie animale
Physique
Chimie
Géologie appliquée
Astronomie

Professeurs sans chaire

MM. FERON
GINET
ASCH
MICHEL Pierre
M^{le} MAITROT
PONASSE
d'INCAN
LEFEBVRE
PERNET
CHERY

Mathématiques
Zoologie
Physique
Minéralogie
Physique
Mathématiques
Physique C.S.U.
Mathématiques
Mathématiques
Physique

MM. GEVIN	Géologie générale
BERGEON	Physique C.S.U
Mle GAUTHERON	Chimie biologique
MM. DESCOTES	Chimie organique
ERBEIA	Physique
Mme ERICSON	Physique générale
MM. LEMOIGNE	Botanique
MARTEL	Mécanique
MATHIEU	Mécanique des fluides
MICHEL Georges	Biochimie
PICARD Philippe	Mathématiques
LEBRETON	Biologie végétale
TOUSSET	Chimie propédeutique

Maîtres de Conférences

MM. DEMARCO	Géologie générale
DAVID Jean	Biologie animale
FEUVRAIS	Physique-Electricité
SCHMITT	Physique C.P.E.M.
LAURENT	Chimie organique
ROT	Mathématiques
BETHOUX	Mathématiques T.M.P.
GUSAKOW	Physique
Mle THOMAS	Chimie minérale
MM. BUCHWALTER	Mathématiques
BOUZON	Mathématiques C.S.U.
COSNIER	Psychophysiologie
Mle LAMOURE	Biologie végétale
MM. PORTHAULT	Chimie C.S.U.
VALLET	Chimie macromoléculaire
HAUGAZEAU	Analyse numérique
ENAY	Géologie
BERTHET	Biologie végétale C.P.E.M.
BRUN	Biologie animale
DELMAU	Physique
EL BAZ	Physique-Electricité

MM. FONTANGES
HUET
REMOND

Physiologie
Chimie C.P.E.M.
Mathématiques

Maître de Conférences adjoint

M. PIERRON

Chimie

Conseiller Administratif

M. BURNET

Secrétaire Principal honoraire

M. ROUX

I N T R O D U C T I O N

Jusqu'en 1961, la revue de la littérature scientifique ne fournissait qu'un nombre très restreint de données sur le métabolisme énergétique et le métabolisme des protéines de la paroi aortique, objet de notre travail.

En particulier l'influence de l'adrénaline sur le métabolisme énergétique de la paroi artérielle, chez le lapin, n'avait été envisagé que par MANDEL. Cet auteur apportait en effet, en 1962 (1), des précisions concernant d'une part la dégradation du glucose et la production d'acide lactique, d'autre part l'activité enzymatique de la lacticodéshydrogénase et de la malicodéshydrogénase dans des aortes de lapins, après injections intra-veineuses d'adrénaline. Cette expérimentation permettait de mettre en évidence une augmentation notable du taux de la glycolyse dans la paroi artérielle sous l'effet de l'adrénaline, indiquant une réduction du rendement énergétique, ainsi qu'un phénomène d'adaptation à l'hypoxie créée par l'adrénaline, se traduisant par une augmentation de l'activité lacticodéshydrogénasique.

En revanche, le métabolisme des glucides était abordé dès 1957, par PANTESCU et coll. (2) qui étudiaient le mode de dégradation du glucose par l'aorte de bovidés.

En 1960, SBARRA et coll. (3) démontraient, à l'aide de glucose 1-¹⁴C et 6-¹⁴C, l'existence de la voie glycolytique dans des coupes d'aorte de cobaye.

BEACUNSFIELD (4), en 1962, utilisant également du glucose marqué, faisait état de l'existence de la voie des pentoses phosphates dans le tissu artériel chez le chien, tandis que MANDEL et KEMPF, après avoir étudié l'équipement enzymatique du tissu aortique chez les bovidés (5), précisaient la part du cycle des pentoses dans la dégradation du glucose dans ce tissu (6, 7).

Enfin NICRUSINI et coll. (8, 9) en 1963, étudiaient l'utilisation de l'acétate et du glucose radio-actifs pour la synthèse des lipides et du glycogène par le parenchyme hépatique et le tissu aortique.

Si bien que lorsque nous avons abordé ce travail en 1962, nous l'avons axé, eu égard aux travaux antérieurs, sur l'étude du métabolisme énergétique dans la paroi aortique, en ayant tout particulièrement en vue les modifications métaboliques induites par l'adrénaline. Le tissu aortique qui se nourrit essentiellement par imbibition représente en effet un matériel biologique de choix pour de telles études. Pour les mêmes raisons, nous avons été conduits à envisager le métabolisme des protéines dans ce tissu. En effet les seules données préalables dont nous disposions, centrées sur ces deux aspects du métabolisme général, étaient rassemblées dans deux publications de MANDEL et

coll. (10,11), se rapportant respectivement à la répartition des nucléotides libres et à l'incorporation de ^{35}S méthionine dans les aortes de bovidés.

Parallèlement, nous nous sommes attachés à étudier l'incidence, sur ces deux métabolismes, du développement expérimental du processus athérosclérogène au niveau du tissu aortique. L'idée directrice de cette partie de notre travail, nous a été inspiré par MANDEL et coll. (12) qui, en 1958, émirent l'idée que l'athérome pouvait être comparé, du point de vue métabolique, à un vieillissement de la paroi artérielle, se traduisant en particulier par une diminution du métabolisme énergétique.

En 1962, MANDEL reprenant, dans une revue générale (1), l'ensemble des résultats obtenus au cours d'une étude comparée du métabolisme effectuée sur des aortes de bovidés jeunes et âgés, émit l'hypothèse que la diminution du métabolisme énergétique, observée au cours du vieillissement, pouvait jouer un rôle dans la genèse de l'athérome.

Selon cet auteur, "l'athérome apparaîtrait comme une lésion naturellement liée au vieillissement du tissu artériel et ayant pour cause primaire le métabolisme énergétique particulier de ce dernier". Cette atteinte du capital énergétique dans un tissu, dont les disponibilités sont déjà faibles, aurait comme conséquence une diminution des processus de biosynthèse, dépendant de l'ATP et notamment la synthèse des enzymes. Cette théorie s'est trouvée renforcée, en 1963, par les travaux de ZEMPLÉNYI et coll. (13), MRHOVA et coll. (14), ainsi que par ceux de LEITES (15) qui ont constaté une diminution de l'activité enzymatique du tissu artériel, au cours de l'athérosclérose expérimentale.

Nous avons donc, dès 1962, abordé conjointement l'étude

du métabolisme énergétique ainsi que de la biosynthèse des protéines dans le tissu aortique, pour essayer d'intégrer, dans leur contexte pathologique, les modifications mises en évidence sous l'effet d'un régime athérogène. L'importance des troubles cardio-vasculaires rencontrés au cours de l'athérosclérose, troubles qui en sont la conséquence directe, justifie l'intérêt que nous avons porté à cet aspect du développement de la lésion athéroscléreuse, dont l'étiologie fort complexe, nous échappe encore.

Après un rappel théorique concernant la structure histologique de l'aorte normale de lapin, animal que nous avons choisi en raison de la facilité particulière avec laquelle il développe expérimentalement des lésions d'athérome, nous décrirons dans un premier chapitre les techniques que nous avons employées et le matériel que nous avons utilisé.

Dans le deuxième chapitre, nous aborderons l'étude de la biosynthèse des protéines, avec des systèmes cellulaires et acellulaires.

Dans le troisième chapitre sera envisagée l'étude du métabolisme énergétique.

Le quatrième chapitre sera consacré à l'étude de l'action de l'adrénaline sur le taux et la vitesse de renouvellement des fractions phosphorylées et des nucléotides adényliques de l'aorte.

Les incidences du régime athérogène sur le métabolisme des protéines et le métabolisme énergétique feront l'objet du cinquième chapitre.

Enfin, dans le sixième chapitre, nous discuterons nos résultats et nous chercherons à tirer les conclusions de notre travail.

Rappel histologique concernant la structure de l'aorte

STRUCTURE DE L'AORTE DE LAPIN NORMAL

Nous rapporterons ici les conclusions des travaux en microscopie électronique de BIERRING et KOBAYASI(16) sur la structure de l'aorte thoracique, qui comprend essentiellement deux tuniques : une interne, l'intima et une externe, la média.

Intima

Les cellules endothéliales reliées par le contact de leurs membranes forment une ligne continue, avec toutefois des dilatations localisées de l'espace intercellulaire. Il n'y a pas de membrane basale ; ceci impliquant une haute perméabilité qui peut être reliée à l'absence de vasa vasorum dans la média.

La couche sous-endothéliale est la partie comprise entre les cellules endothéliales et la première couche épaisse de tissu élastique. Elle est constituée de fibres élastiques ramifiées et de fibres collagènes éparses dans une substance fondamentale de basse densité (correspondant à une forte concentration en eau).

Média

La média forme un tube élastique autour de l'intima. Elle est composée de couches alternées de lamelles élastiques et de cellules musculaires lisses. On compte entre 24 et 27 couches élastiques dans la média de l'aorte de lapin. Les cellules musculaires lisses sont les seules cellules présentes dans la média. Elles sont disposées plus ou moins diagonalement entre les lamelles élastiques qu'elles relient. Les cellules sont séparées les unes des autres par des espaces contenant des fibres collagènes et élastiques. Il n'existe ni vaisseaux sanguins ni fibres nerveuses.

STRUCTURE DE L'AORTE DE LAPIN ATHEROGÈNE

Nous résumons ici la description donnée par PERRIN et Coll. (17). Le lapin constitue très facilement et avec une réactivité quasi constante, des lésions aortiques importantes après quelques semaines de régime hypercholestérolé. Sur le plan strictement histologique la plaque d'athérome ainsi créée évolue en plusieurs stades.

Dans les 15 premiers jours, il n'existe aucune lésion macroscopique et les examens histologiques classiques ne montrent pas de modifications de l'intima. Tout au plus, par la technique du fer colloïdal Chun I Wang et Coll. (18) ont montré une très légère surcharge en muco-polysaccharides de la couche sous-intimale, surtout au contact de la limitante élastique interne. De plus, par la microscopie électronique, Myasnikov et Coll. (19) ont précisé le mode de réaction de l'intima et des cellules endothéliales aux premières semaines d'imprégnation lipidique. On constate alors de discrètes altérations de la limitante élastique avec fragmentation et épaississement segmentaire. Ces anomalies sont localisées et en regard d'elles, on constate une discrète hyperplasie du tissu sous-endothélial réalisant un aspect de petits coussinets faisant saillie à la surface du vaisseau. De plus, dès le dixième jour, on peut constater de très légères inclusions lipidiques dans les cellules endothéliales.

La microscopie électronique permet de saisir la pénétration de ces formations à l'intérieur même de la cellule : les éléments lipidiques y pénètrent très progressivement "comme goutte à goutte". Il y aurait donc participation active de l'endothélium dans la pénétration intrapariétale des graisses. Cependant, il semble aussi qu'un mécanisme passif de perméabilité simple intervienne puisque cette pénétration est fortement accélérée par la hyaluronidase et l'histamine.

Au stade plus tardif, dès la fin du premier mois, l'athé-

rome devient macroscopiquement visible et progresse rapidement dans les mois suivants. Il siège surtout sur la crosse aortique, l'aorte descendante et abdominale où il est souvent très abondant. L'histologie montre alors que les plaques sont formées presque exclusivement de cellules xanthomateuses volumineuses en couches successives. La structure de la plaque est donc essentiellement lipidique et on ne trouve que quelques très rares amas de substances fondamentales entre les cellules et des altérations encore discrètes de la limitante élastique. Il semble que les inclusions lipidiques pénètrent dans la média pour y subir une épuration lymphatique centrifuge qui les conduit dans l'adventice. C'est probablement parce que cette épuration lymphatique est débordée par la marée lipidique que se produit la surcharge considérable et progressive de l'intima. Celle-ci se localise avec électivité sur l'aorte où elle est seule visible macroscopiquement.

L'athérome aortique expérimental du lapin va ainsi en progressant pendant les quatre premiers mois environ. La plaque devient alors manifestement fibreuse. La substance fondamentale devient très abondante, formée de muco-polysaccharides acides avec des flots de dépolymérisation. Les fibres conjonctives deviennent de plus en plus nombreuses en même temps qu'on assiste à une néogénèse élastique et réticulaire, surtout à la partie profonde de la plaque. Conjointement, les inclusions lipidiques se raréfient. On ne trouve presque plus de cellules xanthomateuses et les quelques rares amas graisseux sont extra-cellulaires, situés surtout à la partie moyenne et basse de la plaque.

L'évolution de l'athérome expérimental du lapin passe donc par deux stades très caractéristiques :

- le premier est représenté par une surcharge lipidique cellulaire pratiquement pure, sans réactivité notable de la substance fondamentale ou des éléments conjonctifs.

- A cette passivité première de l'intima à la surcharge

graisseuse, succède tardivement, à partir du troisième mois, un stade de réaction conjonctive intense, probablement du type irritatif, au contact de l'inondation lipidique. Il faut donc un assez long délai pour que l'inertie première disparaisse et que la plaque, d'abord presque uniquement lipidique, devienne fibreuse et conjonctive. Alors est réalisé un aspect qui est très voisin de celui de l'athérome humain.

Il est tout à fait frappant de constater la similitude structurale de la plaque humaine au stade précoce et des plaques d'athérome expérimental du lapin à un moment donné de leur évolution. L'imprégnation lipidique simple est susceptible de réaliser chez l'animal, avec des variations très notables de réactivité intinale d'une espèce à l'autre, des lésions très voisines de celles de la maladie humaine.

MODIFICATIONS INDUITES PAR L'ACTION DE L'ADRENALINE AU NIVEAU DE L'AORTE DE LAPIN

Les modifications histologiques de la paroi aortique du lapin sous l'action de l'adrénaline, ont été étudiées récemment par ANCLA et Coll. (20).

Après injection unique, par voie intra-veineuse d'une dose relativement massive (50 μ g/kg), des prélèvements sont faits à divers intervalles de temps (immédiatement après l'injection, 10 mn, 30 mn, 1 heure et 24 heures après l'injection). Les auteurs ont constaté trois sortes de lésions : oedème, nécrose, calcifications.

L'oedème peut être extra et intra-cellulaire.

L'oedème extra-cellulaire s'exprime par un certain élargissement des espaces intersticiels entre les cellules musculaires de la média. L'oedème provoque aussi un décollement des cellules endothéliales qui s'écartent de la lame élastique interne, et s'en

détachent lorsque la lésion s'accroît.

L'oedème intra-cellulaire peut revêtir différents aspects qui coexistent le plus souvent. Soit il est diffus, et le cytoplasme devient plus transparent ce qui traduit une raréfaction des organites intra-cellulaires. Soit il se forme des bulles cytoplasmiques par protrusion de la membrane cellulaire, qui entraîne une portion de cytoplasme. Soit il apparaît des vésicules intra-cytoplasmiques.

L'oedème atteint aussi les fibres élastiques, donnant une irrégularité de calibre et de densité.

La nécrose se présente sous forme de petits foyers non systématisés traduisant une lyse des éléments musculaires et élastiques.

Les calcifications sont des dépôts de précipitation au sein de petits foyers nécrotiques.

Les lésions atteignent l'aorte proximale (crosse et aorte thoracique), et respectent de façon plus ou moins complète l'aorte abdominale. Elles touchent avec prédilection l'espace sous-endothélial et la zone interne de la média. L'oedème se manifeste sur les prélèvements faits immédiatement après l'injection. Les foyers nécrotiques et calcifiés peuvent se voir au bout d'une heure.

ANCLA et Coll. pensent que l'existence d'un oedème suggère un trouble de la perméabilité cellulaire, et supposent que l'adrénaline agit sur la membrane en provoquant par exemple une modification de sa charge électrique, c'est-à-dire de sa perméabilité aux échanges ioniques.

LISTE DES ABREVIATIONS

Nucléotides

ATP : Adénosine 5'-triphosphate.
ADP : Adénosine 5'-diphosphate.
AMP : Adénosine 5'-monophosphate.
3', 5'-AMP : Adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique.
NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé.
NADP⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé.
GTP : Guanosine 5'-triphosphate.
GDP : Guanosine 5'-diphosphate.
GMP : Guanosine 5'-monophosphate.
CTP : Cytosine 5'-triphosphate.
CDP : Cytosine 5'-diphosphate.
CMP : Cytosine 5'-monophosphate.
UTP : Uridine 5'-triphosphate.
UDP : Uridine 5'-diphosphate.
UMP : Uridine 5'-monophosphate.

Acides Aminés

Glu : Acide glutamique.
Gly : Glycocolle.
Leu : Leucine.
Pro : Proline.
HyPro : Hydroxyproline.

Acides Nucléiques

ADN : Acides Désoxy Ribonucléiques.
ARN : Acides Ribonucléiques.
ARN t : Acides Ribonucléiques de transfert.

Autres abréviations

PM : Phosphate minéral.

PT : Phosphate acido-soluble total.

PL : Phosphate labile provenant de l'hydrolyse spontanée des esters très labiles (phosphocréatine...) à la température ordinaire.

PR : Phosphate résiduel (phosphate des esters des sucres).

Glucose-6-P : Glucose-6-Phosphate.

Fructose-6-P : Fructose-6-Phosphate.

GSH : Glutathion réduit.

PEP : Acide Phosphoénolpyruvique.

KP : Pyruvate Kinase.

PCA : Acide Perchlorique.

TCA : Acide Trichloracétique.

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétate.

Tris : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane.

DNase : Désoxyribonucléase.

En ce qui concerne les nucléotides, les acides aminés, le phosphate inorganique, le glucose-6-phosphate et le fructose-6-phosphate, les abréviations sont celles codifiées par I.U.P.A.A.-I.U.B., Combined Commission on Biochemical Nomenclature (21).

CHAPITRE I

MATERIEL ET TECHNIQUES

A - PRODUITS

- 1-Thyroxine (sel de sodium), Nutritional Biochemicals Corporation (N.B.C.).
- 1-Adrénaline base synthétique des établissements Rhône-Poulenc.
- Acide phosphoénolpyruvique (sel trisodique), Sigma Chemical Company.
- Pyruvate Kinase type 2 (suspension de sulfate d'ammonium), Sigma.

Activité : 1 mg convertit environ 100 μ Moles de PEP en pyruvate par minute à 37° C, à pH 7,6.

- HexoKinase (ATP : D hexose 6 phosphotransférase), Sigma. cristallisée à 120.000 K.M. units/g.
- Glutathion réduit , Sigma.
- Acides Aminés, forme l, N.B.C.
- d-1 Leucine 1-¹⁴C, Commissariat à l'énergie Atomique (C.E.A.). Gif-sur-Yvette.

Activité spécifique 3,8 mC/mM.

- d-1 Proline 1-¹⁴C, C.E.A.

Activité spécifique 4 mC/mM.

- 1-Proline 5-¹⁴C, C.E.A.

Activité spécifique 5 mC/mM.

- Glycocolle 1-¹⁴C, C.E.A.

Activité spécifique 4,1 mC/mM.

- Phosphore radio-actif, sous forme d'une solution de

$\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$, d'une activité de 2 mCi/mM, fourni par le C.E.A.

Cette solution est hydrolysée par HCl normal au bain-marie bouillant pendant 15 minutes et neutralisée par une solution normale de NaHCO_3 .

- Inuline, Prolabo. Préalablement purifiée, à partir d'une solution d'inuline R.P. à 10%, par passage au bain-marie bouillant pendant 30 mn en présence de soude concentrée (5ml pour 100 ml de solution d'inuline). On neutralise avec HCl concentré. On purifie ensuite par précipitation à l'éthanol à 95° (5/1 v:v). Après centrifugation le précipité est redissous en ajoutant 75% du volume d'origine d'eau distillée et en portant au bain-marie bouillant. La précipitation alcoolique est répétée 10 fois. On obtient, après passage à l'étuve, une poudre blanche qui donne dans l'eau une solution pratiquement incolore, dont on prépare une solution mère à 20% que l'on conserve au réfrigérateur.
- Nucléotides adényliques, guanyliques, cytidyliques et Uridyliques : dérivés tri, di et monophosphate, Pabst Laboratories.
- Charbon actif, type Norit SX30, N.V. Norit, Amsterdam.
- Diphénylamine, Prolabo.
- Indol cristallisé, Prolabo.
- Orcinol cristallisé (dihydroxy 3,5-Toluène), Prolabo.
- d-Ribose, Fluka.
- d-désoxyribose, Fluka.
- Acide pyruvique A grade, Acide α cétoglutarique A grade, Calbiochem.
- Acide l-malique, Acide citrique, Acide isocitrique, Acide succinique, N.B.C.
- Acide cholique, Sigma.
- Cytochrome C oxydé de coeur de cheval, Industrie Biologique Française.

- Saccharose pour usages scientifiques, Prolabo.
- Gelose purifiée (Spécial Agar noble), DIFCO, 0-142-01.
- Ethylènediamine tétraacétate ou Versène, Fluka.
- Arséniate de sodium, Prolabo.
- Chloroforme, Merck. Purifié par extractions répétées avec H_2SO_4 concentré, lavages à l'eau distillée, puis déshydraté par passage sur Cl_2Ca pendant 48 heures. On distille ensuite pour obtenir un produit dont le point d'ébullition est de 61° .
- Cholestérol, Prolabo.
- Tris, Merck.
- DNase - Worthington, Freehold, N.J., U.S.A.

B - ANIMAUX

On utilise des lapins mâles d'un poids moyen de 3 kg. Trois types d'animaux ont été choisis pour l'ensemble des expérimentations : des lapins de race commune, des albinos et des lapins consanguins (mères consanguines, saillies par le même mâle, lapins d'une même portée). Ces lapins provenaient tous d'un même élevage (Centre d'Animaux de Laboratoire, Ardenay, Sarthe). Les animaux sont entretenus dans de bonnes conditions de stabulation. Après réception, on laisse s'écouler au moins une semaine avant tout début d'expérimentation pour ne pas risquer d'introduire un paramètre supplémentaire lié aux nouvelles conditions écologiques dans lesquelles sont placés les animaux.

C - TRAITEMENTS

1 - Régime athérosclérogène

Les lots d'animaux soumis à un traitement athérosclérogène ont reçu, pendant respectivement 1, 2 ou 3 mois et demi, une alimentation standard (enrichie en sels minéraux et vitamines) contenant en plus 1 % de cholestérol et 10 % de caséïne ; de l'huile d'olive est utilisée comme excipient.

2 - Adrénaline

La l-adrénaline est injectée par voie intra-veineuse dans la veine marginale de l'oreille, sous forme d'une solution de chlorhydrate 10^{-3} M. Quatre types d'expériences ont été conduites :

a - Les animaux reçoivent une injection unique d'adrénaline de $46 \mu\text{g/kg}$ de poids ; on suit l'évolution des différentes fractions phosphorylées en fonction du temps qui suit l'injection chez les animaux normaux et soumis à un régime hypercholestérolé.

b - Le même phénomène est étudié chez des animaux recevant une dose d'adrénaline 10 fois plus faible ($4,6 \mu\text{g/kg}$ de poids).

c - Les animaux reçoivent pendant 30 jours consécutifs des injections quotidiennes d'adrénaline à des doses croissantes : $2 \mu\text{g}$, $4 \mu\text{g}$, $6 \mu\text{g}$ et $9 \mu\text{g}$ respectivement pendant les première, deuxième, troisième et quatrième semaines. L'adrénaline est alors diluée dans du sérum physiologique stérile à partir d'une solution mère de chlorhydrate d'adrénaline 10^{-2} M. Les animaux sont sacrifiés au bout du trentième jour. Dans toutes les expériences, des animaux témoins appartenant au même lot que les traités ont été utilisés.

d - Des lapins consanguins d'un poids moyen de 2,5 kg reçoivent des injections intra-veineuse de l-adrénaline, à raison de $23 \mu\text{g/kg}$ de poids. On étudie la cinétique d'évolution et la vitesse de renouvellement des nucléotides riches en énergie en fonction du temps qui suit l'injection. Des expériences préliminaires ont montré que le maximum d'effet de l'adrénaline a lieu lorsque l'animal est sacrifié 10 minutes après l'injection.

D - DISSECTION

1) Les animaux sont sacrifiés par fracture de la colonne cervicale et saignés. Après ouverture rapide de la cage thoracique par section du sternum, suivie d'une section médiane de la paroi abdominale, l'aorte est prélevée rapidement et on dissèque soigneusement, sur tablette refroidie, le tissu conjonctif et la graisse externe pour ne conserver que l'intima et la média. On obtient ainsi environ 0,7 à 1 g de tissu frais.

2) En ce qui concerne le foie, le protocole est identique : après prélèvement du foie, celui-ci est lavé dans du sérum physiologique refroidi. On utilise environ 2 g de tissu hépatique pour chaque expérimentation.

3) Le prélèvement et l'extraction des aortes humaines a été conduit selon le protocole suivant :

Nous avons utilisé 25 aortes humaines prélevées après autopsie et nous avons préalablement estimé macroscopiquement l'étendue des lésions pariétales. Cet examen nous a permis de classer les tissus prélevés en quatre catégories 0, I, II, III et d'établir une fiche signalétique exacte en degré d'athérosclérose O.M.S. (22). Nous avons éliminé systématiquement les aortes comportant un pourcentage trop élevé de lésions compliquées, qui interdisent, comme nous l'avons vérifié, tout résultat reproductible. Sur les 25 cas étudiés, 15 intéressaient des individus de sexe masculin, 10 de sexe féminin; l'âge des malades décédés variait de 20 à 80 ans.

Pour chaque expérimentation, on prélève la crosse aortique et une partie de l'aorte descendante allant jusqu'à la bifurcation abdominale. Le tissu est alors disséqué : pour cela, on sépare au scalpel l'intima, ce qui permet d'éliminer le tissu conjonctif et la graisse externe ; en général, une très mince lame de média reste adhérente. Dans les aortes de degré O.M.S. II et III, la séparation de l'intima et de la média est très difficile, voire même impossible. Afin de permettre une étude comparative valable, nous avons prélevé sur chaque aorte, différentes parties de l'intima.

Les fragments aortiques ainsi obtenus sont préalablement lavés dans plusieurs bains d'eau et de sérum physiologique, afin d'éliminer toute trace de sang. Pour s'assurer qu'il ne reste plus aucune trace de protéines sériques, nous avons effectué un contrôle des liquides de lavage, d'abord par la réaction du biuret et ensuite par diffusion sur plaque par la méthode d'OUCHTERLUNY (23) avec un anti-sérum humain total. Après le sixième lavage, ces réactions sont négatives.

E - HOMOGENEISATION

Selon le type d'expérimentation, nous avons utilisé pour le broyage des tissus hépatiques et aortiques, soit un broyeur du type POTTER-ELVEHJEM, à piston de téflon, soit un homogénéiseur BUREX 45, où le broyage est assuré par une lame d'acier tournant à 40.000 tours/minute. Toutes les homogénéisations sont réalisées dans des récipients en verre refroidis extérieurement par de la glace pilée. Les quantités de tissu (de 0,6 à 2 g) sont broyées dans un volume de 8 à 15 ml selon les cas.

F - DETERMINATION DE LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES IN VITRO

1 - Incubations avec les aortes

Les animaux sont sacrifiés par fracture de la colonne cervicale. L'aorte, prélevée très rapidement, est immédiatement immergée dans du tampon de KREBS-HENSELEIT (24) oxygéné et froid. Après dissection de la graisse externe, on prélève des fragments d'environ trois centimètres, que l'on ouvre longitudinalement puis que l'on transvase dans des fioles coniques contenant le liquide d'incubation oxygéné et porté préalablement à 37°.

L'incubation est réalisée en présence de :

3 ml de tampon de KREBS-HENSELEIT

auquel on ajoute l'acide aminé marqué, soit :

2,6 μ moles (10 μ curies) de d-l-Leucine-1- 14 C (activité spécifique : 3,8 mc/mM).

2,5 μ moles de d-l-Proline-1- 14 C (activité spécifique : 4 mc/mM).

2,4 μ moles de Glycine-1- 14 C (activité spécifique : 4,1 mc/mM).

Le volume final de l'incubat est de 4 ml avec la d-l-Leucine et la Glycine, et de 3,5 ml avec la d-l-Proline. L'incubation dure 30 minutes à 37°, sous atmosphère de 5 p. 100 de gaz carbonique et de 95 p. 100 d'oxygène. Au bout de ce temps, les fragments d'aorte sont alors retirés, lavés plusieurs fois avec HCl N, puis avec une solution contenant 1 μ M par litre de l'entraîneur correspondant au traceur utilisé. On vérifie que l'élimination est totale par comptage du dernier liquide de lavage, dans lequel le taux de radioactivité ne doit pas être supérieur au mouvement propre. Puis les fragments aortiques sont lyophilisés et broyés aussi finement que possible au moyen de l'appareil de POTTER-ELVEHJEM (25) en présence d'acétone. La poudre d'aorte ainsi mise en suspension est déposée sur papier-filtre. La radioactivité est mesurée grâce à un compteur GEIGER-MÜLLER à fenêtre et à courant gazeux (rendement 28 p. 100).

Les résultats sont exprimés en coups par minute et par milligramme de protéine, après correction de self-absorption (valeur de $\mu = 0,29 \text{ Cm}^2/\text{mg}$).

2 - Préparations d'enzymes pH 5 et de microsomes

a) A partir du foie

Les enzymes pH 5 et les microsomes du foie ont été préparés par centrifugation fractionnée selon le protocole

de KELLER et ZAMECNIK (26). Après perfusion préalable avec une solution de KCl 0,15 M, 4 grammes de foie sont homogénéisés en moins d'une minute, au broyeur POTTER-ELVEHJEM en présence de 2, 3 volumes de milieu A., dont la composition est la suivante : $MgCl_2$ 0,004 M, $KHCO_3$ 0,035 M, KCl 0,025 M, Saccharose 0,35 M, tampon phosphate 0,02 M.

Le surnageant de la première centrifugation à 20.000 g est soumis à une centrifugation à 105.000 g à 0° pendant une heure (centrifugeuse MARTIN-CHRIST). Les culots de centrifugation des microsomes et des enzymes après précipitation à pH 5,2 par l'acide acétique N et lavages avec du milieu B. ($MgCl_2$ 0,004 M, KCl 0,025 M, Saccharose 0,9 M), sont repris par du milieu A. et amenés à concentrations respectives d'environ 20 mg et 8 mg de protéines par ml. La teneur en protéines est appréciée par la technique de GORNALL (27).

Nous avons également utilisé pour la préparation des ribosomes de foie une technique mise au point par BLOEMENDAL et coll. (28) qui fait appel à une centrifugation en gradient de saccharose. Le protocole est le suivant:

On laisse jeûner les animaux pendant une nuit avant de les sacrifier. Le foie est ensuite prélevé, lavé et homogénéisé dans 2,5 ml de milieu, refroidi à 0°, par gramme de tissu frais. Le milieu contient du saccharose 0,35 M, du tampon Tris 0,05 M à pH 7,6, du KCl 0,025 M et du $MgCl_2$ 0,01 M (milieu B.). On utilise un homogénéiseur du type POTTER-ELVEHJEM à piston de téflon refroidi à 0° (4 révolutions à 500 t/mn). Les noyaux, les mitochondries et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 15.000g pendant 10 minutes (ultra centrifugeuse préparative SPINCO L 50, ROTOR 30). 15 ml de surnageant à 15.000g sont soigneusement déposés, dans un tube à centrifuger, au sommet d'un gradient discontinu de saccharose, consistant en 10 ml de saccharose 2M dans du milieu B. et 10 ml de saccharose 0,6M dans du milieu B. Après une centrifugation à 75.000g pendant 6 à 8 heures à 0° (SPINCO L 50, ROTOR 30), on obtient un culot de ribosomes qui peut être facilement remis en solution.

A l'interface des solutions de saccharose 2M et 0,6M on observe des bandes rougeâtres et jaunes qui correspondent à des pigments et des fragments grossiers de réticulum endoplasmique. Les ribosomes de cette fraction ne peuvent être séparés des membranes même en répétant le protocole d'isolement. Le culot de ribosomes ainsi obtenu peut être conservé à -20° , sans perdre sa capacité d'incorporer les acides aminés. Pour éviter une éventuelle contamination par l'ADN, on peut incuber les ribosomes en présence de DNase ($1 \mu\text{l/ml}$). Les propriétés biologiques et physico-chimiques de ces ribosomes sont ensuite évaluées d'une part par incorporation de Leucine-1- ^{14}C dans les protéines ribosomales, d'autre part par la détermination du rapport ARN/protéines. Pour cela, on prélève une partie aliquote du culot redissous que l'on traite par NaOH N pendant une heure à 37° . Les protéines sont précipitées par addition de PCA (concentration finale 5 %). L'ARN est évalué en mesurant l'absorption à $260 \text{ m}\mu$ (1 mg d'ARN donne une absorption de 22,7). Les protéines sont déterminées selon la technique de LOWRY et coll. (29).

b) A partir d'aortes

Le protocole est identique. Nous avons utilisé en moyenne de 8 à 10 g d'aorte. Celles-ci, sitôt prélevées, sont dégraissées dans du milieu A. froid, puis rapidement disséquées sur une plaque de marbre avec des ciseaux refroidis, de manière à ne conserver que l'intima et la média. L'homogénéisation est réalisée en présence de 7 volumes de milieu A., au moyen d'un homogénéiseur VIRTIS 45. Toutes les opérations sont conduites le plus rapidement possible au voisinage de 0° .

3 - Incubations avec les surnageants à 5.000 g

L'homogénéisation au VIRTIS 45 est suivie d'une centrifugation immédiate pendant 10 minutes à 0° et à 5.000 g. Le surnageant est ensuite pipeté avec soin et utilisé immédiatement

pour l'incubation.

Le milieu d'incubation complet contient :

4 ml pour l'aorte.

Le surnageant à 5.000 g :

0,2 ml pour le foie.

0,1 ml d'ATP (10 μ moles).

0,1 ml de PEP (10 μ moles).

0,1 ml de KP (0,02 mg).

0,1 ml de GTP (0,25 μ moles).

0,1 ml de GSH (1 μ mole).

0,1 ml d'acides aminés non marqués (0,1 μ mole de chaque).

On ajoute alors, suivant l'expérimentation, 0,2 ml de d-1-Leucine-1-¹⁴C (0,52 μ M soit 2 μ curies), 0,1 ml de d-1-Proline 1-¹⁴C (0,50 μ M), ou 0,2 ml de Glycine-1-¹⁴C (0,48 μ M) ce qui porte le volume final à 4,8 ml avec la Leucine et la Glycine, et à 4,7 ml avec la Proline, pour le surnageant d'aorte, contre respectivement 1 et 0,9 ml pour le surnageant de foie.

Les cofacteurs et les acides aminés marqués sont mis en solution dans du tampon phosphate 0,02 M, pH 7,8.

Les incubations sont effectuées directement dans des tubes à centrifuger à tête conique, préalablement thermostatés au bain-marie à 37°. Elles durent 10 minutes, sous atmosphère d'azote 95 p. 100 et de gaz carbonique 5 p. 100. La réaction enzymatique est alors arrêtée par addition de deux volumes d'acide trichloracétique froid à 10 p. 100. La protéine marquée précipitée est purifiée par lavage avec du TCA à 4 p. 100 (pour déplacer les protéines de faible poids moléculaire, les peptides et les aminoacides), extraite avec du TCA à 90 p. 100 pendant 20 minutes (pour déplacer les acides nucléiques), traitée par l'éthanol à 95°, puis par le mélange éthanol-éther-chloroforme (pour entraîner les lipides) et enfin par l'éther. On a soin, au cours des extractions et des lavages, de bien remettre le précipité en suspension pour permettre un contact aussi complet que possible avec le solvant.

La protéine séchée pendant une nuit, soit à l'air, soit à l'étuve à 60°, est ensuite remise en suspension dans 15 ml d'acétone puis homogénéisée dans un appareil de PUTTER-ELVEHJEM en verre et déposée sur filtre en fibre de verre à filtration rapide. On réalise des étalements très homogènes en filtrant sous faible aspiration par trompe à vide, grâce à un filtre spécial en nylon. Puis, la radioactivité est mesurée avec un compteur GEIGER-MÜLLER à fenêtre et courant gazeux.

4 - Incubations avec le système enzyme pH 5-microsomes

Nous avons suivi le protocole de KELLER et ZAMECNIK (26), en modifiant toutefois dans le milieu d'incubation, la quantité d'ATP (10 μ moles au lieu de 1 μ mole), d'acides aminés marqués (0,50 μ mole en moyenne au lieu de 0,10 μ mole) et en introduisant en plus une μ mole de glutathion, ceci pour rester dans des conditions comparables à celles employées pour les incubations de routine avec le surnageant à 5.000 g. Les incubations durent 10 minutes à 37° et à pH 7,4, sous atmosphère de gaz carbonique 5 p. 100 et d'azote 95 p. 100. Après précipitation trichloracétique, la protéine est traitée selon le protocole décrit plus haut, proche de celui de SIEKEVITZ (30).

5 - Incorporation de ^{14}C -Leucine dans les protéines ribosomales du foie

Les incubations sont réalisées à 37° pendant 30 minutes en présence des cofacteurs suivants :

- 1 ml de suspension ribosomale (correspondant à 3 g de foie),
- 0,1 ml d'enzyme pH 5 (0,4 mg de protéines),
- 0,1 ml de surnageant à 105.000 g (1 mg de protéines),
- 0,2 ml de d-l-Leucine ^{14}C (0,5 μC),
- 0,1 ml d'un mélange de l-acides aminés ^{12}C (0,1 μ mole de chaque) moins la leucine,

1 μ mole d'ATP,
0,5 μ mole de GTP,
10 μ moles de PEP,
50 μ g de Pyruvate Kinase,
10 μ moles de $MgCl_2$,
0,14 mmole de KCl,
0,1 mmole de tampon Tris pH 7,6,
0,7 mmole de Saccharose,
10 μ moles de cystéamine ou de glutathion ;

Volume final 2 ml. Les incubations sont stoppées par addition de TCA à 5 %. Puis après précipitation et purification des protéines, selon le protocole décrit au paragraphe 3, la radioactivité est mesurée soit dans un compteur à fenêtre ultra-mince (Mylar) à courant gazeux, soit par scintillation liquide (Packard Tricarb).

6 - Incorporation de la Proline 5- ^{14}C dans le collagène de l'aorte et du foie

On utilise pour les incubations environ 1 g de tissu aortique (intima + média) et 1,5 g de coupes de foie. Les fragments de tissu sont incubés à 37° dans des erlenmeyers de 25 ml pendant 2 heures sous atmosphère d'oxygène (95 % O_2 , 5 % CO_2) en présence de 10 ml de tampon de KREBS pH 7,4 (31) enrichi en ATP (200 μ moles). En début d'incubation, on ajoute 0,1 ml de Proline 5- ^{14}C , à raison de 15 μ C par fiole. En fin d'incubation, les tissus sont traités selon le protocole de HURYCH et CHVAPIL (32).

On décante le milieu d'incubation puis les fragments tissulaires sont lavés 3 fois avec du tampon de KREBS contenant 0,01 % de Proline ^{12}C , comme entraîneur. Après centrifugation (10.000 g), les culots sont homogénéisés avec un Virtis 45, en présence de 15 ml de NaCl 0,2 M. On laisse reposer les homogénats,

transférés dans des tubes à centrifuger, pendant 20 heures à + 4°. Après centrifugation, on fait une deuxième extraction avec NaCl 0,2 M dans les mêmes conditions. Ces deux extractions préliminaires éliminent le collagène soluble (procollagène). Puis le collagène insoluble est extrait au bain-marie bouillant, par du TCA à 5 % pendant 90 minutes. Après centrifugation on répète une deuxième fois l'extraction et on réunit les deux surnageants.

Après lavage du culot par 2 ml de TCA froid, les deux surnageants sont soumis à une dialyse contre eau distillée, à + 4° pendant une nuit. Le liquide du sac de dialyse est évaporé partiellement puis on hydrolyse le résidu protéique par HCl 6 N à l'étuve à 105° pendant 16 heures. Les hydrolysats sont amenés à 10 ml, en ballons jaugés. On détermine ensuite l'activité spécifique de la Proline par la technique de PETERKOFKY et PROCKOP (33).

Pour cela, on dose la Proline, à partir de 5 ml d'hydrolysate, selon la technique de TROLL et LINDSAY (34) et on détermine ensuite la radioactivité au compteur à scintillation Packard (rendement 63 %). Au préalable on convertit la Proline en acide Pyrrole carboxylique, soluble dans le toluène, de la façon suivante :

On ajoute, à 5 ml d'hydrolysate, 2 ml de tampon pyrophosphate pH 8, puis on oxyde la Proline par la chloramine T 0,15 M (1 ml) qu'on laisse agir 20 minutes à la température ambiante. On arrête l'oxydation par 0,4 ml de thiosulfate 2 M. On extrait ensuite l'acide Pyrrole carboxylique, par 10 ml de Toluène, en présence de NaCl à saturation. Le comptage est ensuite effectué à partir de 6 ml d'extrait toluène.

Parallèlement on traite de la même façon un blanc (5 ml d'H₂O, 1 ml de Proline ¹²C à 6 mg/ml) et un témoin (5 ml d'H₂O, 1 ml de Proline ¹²C, et 0,03 µC de Proline 5-¹⁴C) pour pouvoir calculer le rendement d'extraction (de 50 à 70 %).

L'activité spécifique de la Proline est exprimée en coups/mn/ μ mole, en tenant compte du taux de Proline présente dans l'hydrolysate, ainsi que du rendement d'extraction et du rendement du compteur à scintillation.

7 - Analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique des protéines solubles de l'aorte humaine

Le tissu aortique est broyé à 0° dans un homogénéiseur Biorex H 45, en présence de 1 ml de chlorure de sodium à 9 % par gramme de tissu frais. Après une extraction de 24 heures à + 4°, le broyat est centrifugé à basse température pendant 20 minutes à 40.000 g. Le surnageant contenant les protéines extractibles par le chlorure de sodium, peut être utilisé soit directement, soit après extraction à l'éther refroidi à - 25°.

Pour l'immunoélectrophorèse, nous avons utilisé la technique de SCHEIDEGGER (35), en appliquant une tension de 6 volts par cm. La coloration est réalisée à l'Amidoschwartz ou au vert Lumière. Les anti-sérums employés ont été, d'une part l'anti-sérum humain total et d'autre part, les anti-sérums humains spécifiques anti α_1 , α_2 et β lipoprotéines, anti γ_{1M} et γ_{1A} globulines.*

L'électrophorèse sur papier a été conduite selon les données classiques, avec un papier Schleicher et Schull n° 2.043 aMgl, en tampon véronal pH 8,4, force ionique 0,1, pendant 10 heures sous une tension de 110 volts et une intensité de 2 milli-ampères. Le volume déposé était de l'ordre de 60 microlitres. La coloration a été réalisée avec l'Amidoschwartz pour les protéinogrammes, le noir Soudan pour les lipidogrammes.

* Anti-sérum de cheval n° 223 et 306 Institut Pasteur, Paris.
Anti-sérum de lapin, Behring Werke A.G., Marburg-Lahn.

G - DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

1) Protocole d'isolement (d'après SCHMIDT et TANNHAUSER (36) SCHNEIDER (37 et UGUR et ROSEN (38).)

Une représentation schématique de ce protocole est donnée dans la figure 1.

Les tissus sont homogénéisés au Virtis 45 en présence de PCA 0,3 N, à raison de 5 ml par g de tissu frais pour le foie et 10 ml par g de tissu frais pour l'aorte.

On laisse reposer pendant 2 à 3 heures à + 4° puis on centrifuge à 3.000 t/minute pendant 5 minutes.

On décante le surnageant qui peut être utilisé pour mesurer les nucléotides libres.

Au précipité on ajoute 1 ml de PCA 0,3 N. On décolle le culot et on centrifuge à 3.000 t/minute durant 5 minutes.

Le surnageant est décanté et on ajoute 1 ml de PCA 0,3 N au précipité.

Après centrifugation à 3.000 t/minute pendant 5 minutes, on décante le surnageant.

Ces trois surnageants contiennent les nucléotides libres.

Le précipité obtenu est additionné de 1 ml de méthanol à 95°, froid.

On centrifuge à 3.000 t/minute durant 5 minutes, puis on décante le surnageant qui contient les phospholipides.

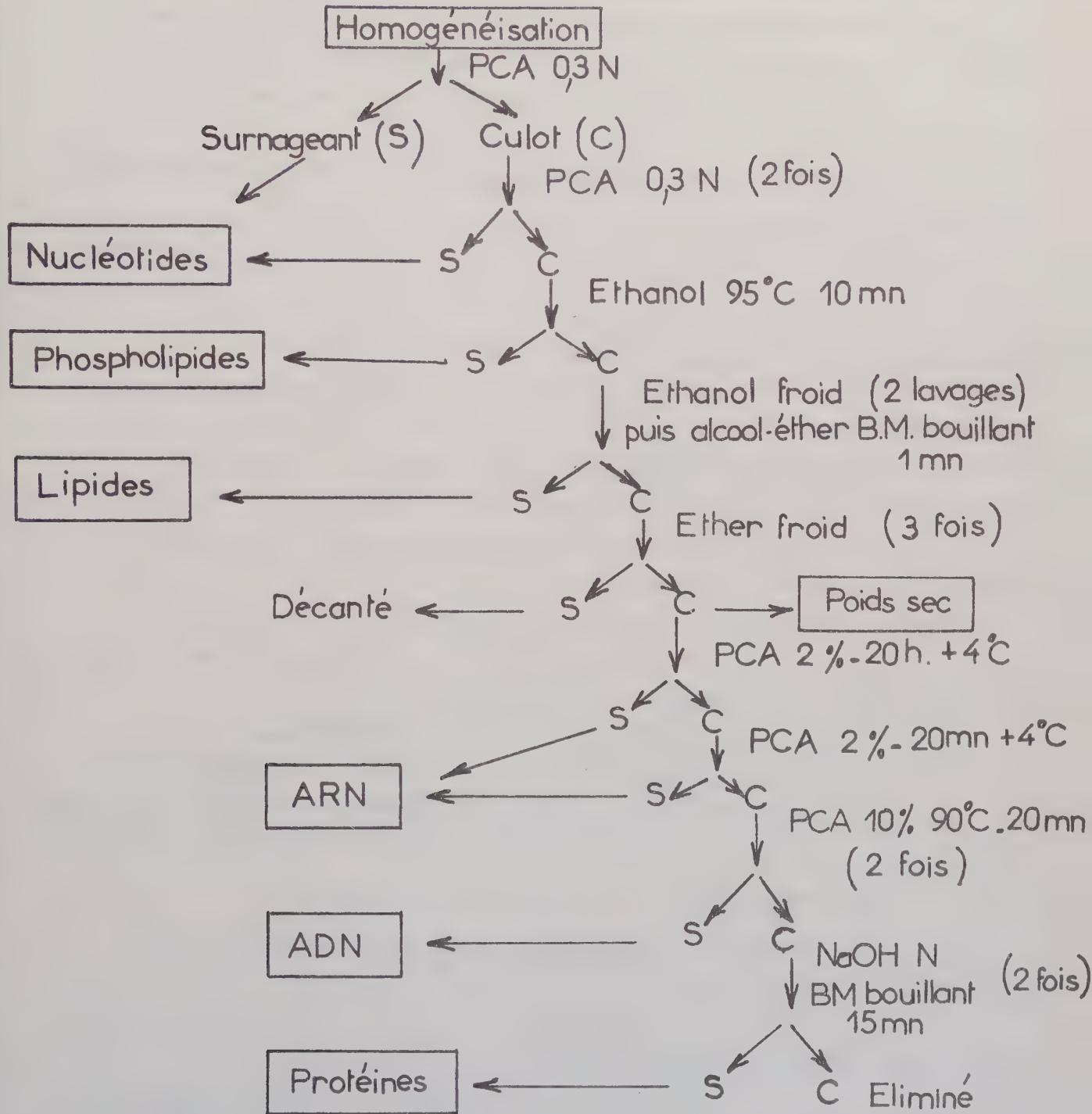
Après deux lavages avec le méthanol à 95°, on ajoute 1 ml d'alcool-éther (3-1) et on porte au bain-marie bouillant durant 1 minute (une seule fois).

On centrifuge à 3.000 t/minute durant 5 minutes et on décante le surnageant. Cette opération est répétée deux fois.

A partir de ce stade il faut opérer à froid.

FIGURE 1

Protocole d'isolement des Acides nucléiques



On ajoute 1 ml d'éther, on centrifuge et on décante le surnageant. Cette opération est renouvelée trois fois.

Le précipité obtenu est desséché par chauffage dans un dessiccateur sous vide.

Après dessiccation, on détermine, par pesées successives jusqu'à poids constant, le poids de tissu sec.

On ajoute alors 1 ml de PCA à 2 % et on laisse reposer 20 heures à + 4°.

On centrifuge ensuite à 2.000 t/minute durant 5 minutes et on recueille le surnageant.

On reprend le précipité par 1 ml de PCA à 2 % et on laisse reposer 20 minutes à + 4°.

Après centrifugation, les deux surnageants recueillis contiennent l'ARN.

Au précipité obtenu on ajoute ensuite 1 ml de PCA à 10 % et on porte au bain-marie à 90° durant 20 minutes.

On centrifuge et on garde le surnageant. On répète une deuxième fois cette opération.

Les deux surnageants recueillis contiennent l'ADN.

Enfin on ajoute 1 ml de NaOH N au précipité, et on porte au bain-marie bouillant 15 minutes.

On centrifuge et on ajoute 1 ml de NaOH N.

On porte à ébullition 15 minutes puis on centrifuge.

Les deux surnageants recueillis contiennent les Protéines.

2) Dosage d'ARN

Nous avons utilisé la technique de SLATER (39) modifiée par ZALTA (40).

a) Principe

Cette méthode de dosage est basée sur la colorimétrie du ribose (réaction à l'orcine) et elle permet de tenir compte de l'interférence du saccharose qui est à la base des milieux

d'extraction habituellement utilisés pour la préparation des particules cellulaires. Le ribose en milieu acide (HCl) donne du furfurool qui se combine à l'orcinol pour donner une coloration verte. On lit au photomètre à 670 m μ .

b) Procédé

Le dosage se fait sur 1 ml de solution à doser auquel on ajoute 2 ml d'eau, puis on introduit successivement 3 ml de perchlorure de fer à 0,1 % et 0,3 ml d'orcinol à 10 % (préparation extemporanée dans l'éthanol absolu).

On chauffe au bain-marie bouillant pendant 45 minutes. Après refroidissement on traite par 7 ml de mélange de chloroforme-éther, puis on laisse décanter plusieurs heures (la couleur reste stable 24 heures au moins). La couleur reste dans la phase aqueuse. On lit ensuite au photomètre à 520 et 670 m μ .

c) Calcul

La concentration d'ARN est donnée par la formule suivante :

$$\text{ARN } \mu\text{g} = \frac{3,11 \times E_{670} - E_{520}}{11,92} \times 10^3 \text{ dans le volume final.}$$

E 670 = absorption maximum du ribose

E 520 = absorption maximum du saccharose

d) Solution étalon

On peut utiliser soit l'acide ribonucléique soit l'acide adénylique, soit enfin le ribose seul. On fait également une solution étalon de saccharose.

On fait deux lectures pour le saccharose à 520 m μ , et deux lectures pour le ribose à 670 m μ .

Le résultat final, exprimé en pourcentage, est rapporté au poids sec.

3) Dosage d'ADN

I - Méthode à la diphénylamine

a) Principe

La réaction de DISCHE (41) à la diphénylamine, modifiée par BURTON (42) permet de doser à la température du laboratoire avec une bonne sensibilité le désoxyribose, les composés à base de ce pentose après sa libération par hydrolyse et, par conséquent, les acides désoxyribonucléiques (ADN) grâce à la coloration qu'il donne avec l'amine, en présence d'acétaldéhyde au bout de 16 à 20 heures.

b) Mode opératoire

Préparation de la solution d'ADN en vue du dosage

Ce dosage est fait à partir d'une solution d'ADN dont la concentration en acide perchlorique est amenée à 0,5 N. Dans ces conditions, il apparaît un trouble qu'on élimine par chauffage au bain-marie à 70° (15 minutes sont généralement suffisantes, ne jamais dépasser 30 minutes), l'ADN hydrolysé repasse en solution.

REMARQUE

La concentration de l'acide perchlorique peut varier de 0,25 à 0,65 N sans produire d'effets sensibles sur la coloration finale.

Mise en oeuvre du dosage

Dans un tube de 10 ml, verser

1 ml de solution à doser (1 à 6 µg de phosphore)

2 ml de réactif à la diphénylamine (solution

aqueuse d'acétaldéhyde pure, redistillée à 1,6 % 0,25 ml, réactif à la diphénylamine 50 ml : diphénylamine 1,5 g, acide acétique 100 ml, H₂ SO₄ concentré 1,5 ml).

Préparée extemporanément, cette solution doit rester incolore. On agite et on laisse en contact 20 heures à la température du laboratoire. On lit contre un témoin réactif à 600 mμ. Le témoin réactif est obtenu en remplaçant la solution à doser par 1 ml de PCA 0,5 N.

c) Etalonnage

L'étalonnage est obtenu dans les mêmes conditions à partir du désoxyribose pur (prise d'essai de 1 à 10 μg de désoxyribose).

Lors du dosage de l'ADN, seule le désoxyribose lié aux bases puriques entre en réaction, ce qui revient à doser sensiblement la moitié du désoxyribose total. On a toujours :

$$\frac{\text{Mole de désoxyribose dosé}}{\text{Atome g de P dans l'ADN}} = 0,46 \text{ à } 0,48$$

REMARQUE

L'étalonnage peut être obtenu à partir d'un ADN pur. La courbe étalon est tracée en portant en abscisse les concentrations en phosphore désoxyribonucléique (ADN-P) et en ordonnée les densités optiques correspondantes. La valeur de cet étalonnage dépend de l'absence dans l'ADN étalon d'impuretés phosphorées ; par contre, elle est indépendante de l'origine de l'ADN. On a alors pour 1 μg d'ADN-P une densité optique de 0,130.

II - Méthode à l'Indol

La méthode de DISCHE à la diphénylamine permet de doser l'ADN à des concentrations variant entre 25 et 250 μg par ml. La méthode de CERIOTTI (43, 44), que nous avons utilisée parallèlement, est environ 10 fois plus sensible. Cette méthode présente, en outre, l'avantage d'être très spécifique.

a) Principe

Cette méthode est basée sur la mesure de l'intensité de la coloration produite lors de la réaction entre l'indol et le désoxyribose, lié aux bases puriques et pyrimidiques de l'ADN, à chaud et en milieu acide (HCl).

b) Procédé

A 2 ml de la solution à doser introduite dans un tube à centrifuger, on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse d'indol à 0,04 %, et 1 ml d'HCl concentré. On agite le mélange et on porte au bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Le tube est ensuite refroidi, sous eau courante, et la solution est extraite 3 fois avec 4 ml de chloroforme, préalablement purifié (Cf : Produits, Chapitre I) et centrifugée. On obtient ainsi une phase aqueuse complètement limpide. L'intensité de la coloration jaune qui se développe est lue à 490 m μ (spectrophotomètre Beckmann D.B) contre un blanc traité de manière identique.

Une légère coloration rosée peut apparaître dans le tube à doser et dans le blanc mais elle est facilement éliminée par une extraction supplémentaire avec le chloroforme.

La coloration obtenue est stable pendant plusieurs heures. L'étalonnage est obtenu, comme dans la technique à la diphénylamine, à partir du désoxyribose pur.

Les meilleurs résultats sont obtenus pour des concentrations de 5 à 15 μ g par ml.

H - MESURE DE L'ESPACE LIQUIDIEN EXTRA-CELLULAIRE

1) Méthode à l'inuline in vitro.

L'inuline est un polyoside, d'origine végétale, constitué d'une trentaine d'unités de fructose, dont le poids moléculaire est d'environ 5.000.

Principe

Le tissu est placé dans une solution tampon isotonique et oxygénée contenant de 0,3 % à 1 % d'inuline. L'incubation peut se faire à des températures variables ; soit à 0°, soit à la température du laboratoire, soit enfin, à 37-38°. Le temps d'incubation est en général de une à deux heures, à 37°.

En ce qui concerne le dosage dans les tissus, plusieurs procédés peuvent être utilisés : soit le broyage dans une solution d'acide trichloracétique suivi d'une centrifugation, et prélèvement du liquide surnageant ; soit la diffusion dans l'eau : le tissu est alors placé pendant plusieurs heures dans de l'eau distillée avec agitation continue ; enfin le tissu peut être solubilisé par chauffage dans une solution alcaline.

Les méthodes de dosage sont très nombreuses. Par chauffage, en milieu acide, l'inuline sous forme de fructose est déshydratée en hydroxyméthylfurfural qui conduit à des produits de condensation fortement colorés avec des amines et des phénols.

Le plus souvent les protéines sont précipitées soit par l'acide trichloracétique, soit par le réactif de SOMOGYI (45).

Nous avons utilisé la méthode de dosage de ROSS et MOKOTOFF (46) qui met en jeu la solubilisation du tissu par une solution de soude. Il est donc indispensable de pouvoir disposer

d'une forme d'inuline stable dans les solutions alcalines diluées et chaudes. Pour cela, nous avons appliqué la technique de purification de WEIL (47) (Cf. Produits, Chapitre I).

Technique

L'aorte est placée dans un erlenmeyer contenant 10 ml de tampon de Krebs (31) auquel on ajoute 0,2 ml de solution d'inuline purifiée à 20 %, ce qui correspond à une concentration finale de 0,4 %. A 0°, après saturation du milieu en O₂/CO₂ (95 %/5 %), l'erlenmeyer, bouché, est mis dans la glace fondante et agité de temps en temps. On laisse diffuser pendant 3 heures. A 37° l'incubation dure 1 heure.

Le tissu aortique qui pèse de 300 à 500 mg (contenant de 0,3 à 1 mg d'inuline environ), est placé ensuite dans un tube gradué à 20 ml, avec 2,4 ml de soude 0,85 N. Le tube est placé au bain-marie bouillant jusqu'à solubilisation complète du tissu, c'est-à-dire environ 15 minutes, en agitant à des temps réguliers. On neutralise par 0,8 ml d'HCl 2,5 N. Les protéines sont ensuite précipitées par le mélange de SOMOGYI :

- 4 ml de Zn SO₄, 7 H₂O, 10 %
- 4 ml de Na OH 0,5 N.

On complète à 20 ml avec de l'eau distillée. On agite vigoureusement, on laisse reposer, et on filtre. On transfère 1 ml en double exemplaire dans des tubes fermés. On ajoute 0,33 ml de réactif à la résorcine (0,1 g de résorcine, 0,25 g de thiourée dans 100 ml d'acide acétique glacial. Cette solution se conserve au moins 2 mois dans un flacon en verre coloré, à l'obscurité), et 2 ml d'HCl concentré (densité 1,19). Les tubes sont placés au bain-marie à 80° ± 1° pendant 10 minutes à l'obscurité. Les tubes sont ensuite refroidis dans l'eau et maintenus à l'abri de la lumière. On lit à 520 mμ.

Le liquide d'incubation est traité de la même façon en utilisant 0,1 ml prélevé avec une pipette de précision.

Réalisation des blancs

Le tissu est également traité par la soude 0,85 N ; on y ajoute 1,2 ml d'acide chlorhydrique 5 N, et on laisse au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. Puis on met 2,6 ml de soude 4 N, et on laisse au bain-marie pendant 15 minutes. On neutralise par 1,2 ml d'HCl 5 N. On précipite les protéines par le mélange de SOMOGYI et on filtre. On transfère 0,66 ml de filtrat (et non 1 ml, car il y aurait précipitation de $ZnCl_2$ du fait de la grande quantité de NaCl). On complète à 1 ml avec de l'eau distillée. On ajoute la résorcine et l'acide chlorhydrique, et on traite de la même façon que précédemment.

ROSS et MOKOTOFF ajoutent une quantité connue d'inuline, et lisent le blanc-tissu contre un blanc réactif contenant la même quantité d'inuline. Nous avons estimé que cela pouvait être une cause d'erreur, et nous avons directement mesuré le blanc-tissu contre le blanc réactif. Le blanc-réactif, utilisé pour faire le zéro du photomètre, comprend 2,4 ml de NaOH 0,85 N, 0,8 ml de HCl 2,5 N, et le mélange de SOMOGYI, soumis aux mêmes opérations que précédemment.

La densité optique correspondant au blanc dans le tissu à étudier, est ainsi calculée :

$$D.O \text{ blanc-tissu} \times \frac{3}{2} \times \frac{\text{poids du tissu à étudier}}{\text{poids du tissu-blanc}}$$

On fait une courbe étalon avec des solutions d'inuline contenant de 5 à 50 $\mu\text{g/ml}$.

L'espace de diffusion est calculé en faisant le rapport :

$$\frac{\text{concentration dans l'aorte en D.O}}{\text{concentration dans le liquide en D.O}} \quad \text{et ex-}$$

primé en ml pour 100 g de poids frais.

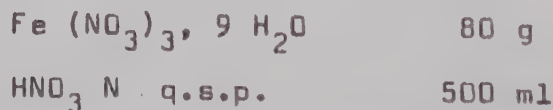
2) Méthode au thiocyanate, in vivo

L'ion SCN^- ne pénètre pas dans les cellules, mais diffuse rapidement du sang dans le liquide interstitiel.

Après injection à un animal de thiocyanate, un dosage de celui-ci dans le plasma et dans un broyat d'organe donnera le volume occupé dans l'organe par le liquide extra-cellulaire (sang et liquide interstitiel).

On injecte au lapin, 2 ml d'une solution à 20 %, par voie intraveineuse, et on sacrifie l'animal 10 minutes plus tard. On recueille le sang qu'on laisse coaguler. On prélève 0,1 ml de sérum que l'on déprotéinise dans 5 ml de TCA à 5 %, puis on centrifuge. L'aorte est placée dans de l'eau distillée pendant 24 heures. Puis on ajoute 1 ml de TCA à 50 % et on complète à 10 ml avec de l'eau. On agite vigoureusement et on filtre. L'ion SCN^- est dosé dans le filtrat et dans le liquide surnageant par la méthode de BOWLER (48), c'est-à-dire par dosage colorimétrique du sulfocyanure ferrique.

On mélange, à parties égales, 1,5 ml de filtrat et 1,5 ml de réactif de BOWLER :



et on lit immédiatement au colorimètre à 470 m μ , contre un blanc constitué de liquide ou de sérum ne contenant pas de thiocyanate et soumis aux mêmes opérations.

3) Méthode au phosphate radio-actif

Principe

Le tissu est placé dans un milieu d'incubation contenant le traceur. On détermine la concentration du traceur dans le tissu en pourcentage par rapport au liquide d'incubation en fonction du temps. On obtient une courbe à deux pentes. La pente rapide correspond à la pénétration dans le fluide extra-cellulaire et la pente lente à l'entrée dans les cellules.

Si l'on admet que le traceur se trouve à la même concentration dans le liquide extra-cellulaire et dans le milieu d'incubation, en extrapolant la deuxième partie de la courbe au temps 0, on obtient la valeur de l'espace extra-cellulaire.

Technique

L'espace extra-cellulaire de l'aorte a été déterminé selon la méthode de CLAUSER et coll. (49). La vitesse d'incorporation du phosphate marqué, en fonction du temps, dans le phosphate total du tissu a été étudiée in vitro, en incubant l'aorte thoracique totale, rapidement prélevée et disséquée, dès le sacrifice de l'animal. Avant l'incubation, l'aorte est ouverte longitudinalement, et segmentée en 2 ou 3 fragments. Les incubations sont réalisées à 37° dans un appareil de WARBURG sous atmosphère de O_2CO_2 (95 % - 5 %) pendant respectivement 2, 5 et 10 minutes, en présence soit de sérum de lapin, soit de tampon de Krebs bicarbonate pH 7,4, pour un volume total de 10 ml. Le précurseur radio-actif est ajouté au temps 0 après 5 minutes de thermostatisation à la dose de 20 μC .

En fin d'incubation, les fragments d'aorte sont rapidement sortis du milieu, soigneusement exprimés entre deux feuilles de papier filtre, puis sont immédiatement broyés dans un homogénéiseur BIUREX, refroidi à 0°, en présence d'acide trichloracétique à 10 % (10/1 V/P).

Après centrifugation de l'homogénat, à 0° pendant 20 minutes à 20.000 g, on dose à partir du surnageant les nucléotides acido-solubles, ainsi que les différentes fractions phosphorylées, et on évalue parallèlement, sur des parties aliquotes, la radio-activité spécifique pour chacune des fractions ainsi isolées. On détermine parallèlement la concentration et l'activité spécifique du phosphate minéral du milieu d'incubation.

Ce protocole est détaillé au paragraphe J.

I - ISOLEMENT ET DOSAGE DES NUCLEOTIDES.

Pour séparer et doser les nucléotides, nous avons employé la technique de THRELFALL(50) qui comprend : une adsorption par le charbon actif (sur colonne), une chromatographie sur papier et un dosage du phosphore contenu dans les nucléotides.

a) Préparation de l'extrait

Le tissu est broyé dans de l'acide trichloracétique 10 % (10 ml/g de tissu frais). On centrifuge pendant 15 minutes à 20.000 g et 0°. Les nucléotides se retrouvent presque quantitativement dans le liquide surnageant : deux autres extractions du culot de centrifugation n'augmentent la quantité de composés phosphorylés acido-solubles récupérés que de moins de 5 % (51).

On sépare les nucléotides de la solution par adsorption sur charbon actif et élution par la pyridine à 50 %.

Le surnageant trichloracétique doit être débarrassé entièrement de l'acide trichloracétique qui empêche l'adsorption. Pour cela, on agite l'extrait, quatre fois de suite, avec un volume égal d'éther que l'on élimine par aspiration en opérant toujours à 0°.

On évapore l'éther restant dans la solution par barbotage d'air filtré, à 0°, pendant 10 minutes.

b) Adsorption et élution sur colonne

On utilise des colonnes en verre de 2 mm de diamètre et de 10 cm de haut, surmontées d'une partie élargie de 1 cm de diamètre et 12 cm de haut, et reliées à une source d'air comprimé, filtré.

L'adsorbant est de la "Norit SX 30 Spécial" que l'on dilue, pour faciliter le passage des liquides, avec un poids égal d'"Hyflo-supercel" lavé plusieurs fois à l'acide chlorhydrique normal, rincé à l'eau distillée et séché à l'étuve vers 100 - 150°.

On charge la colonne avec 250 mg de ce mélange, et on fait passer sous pression de 1 atmosphère 2 ml de Versène (acide éthylènediaminetétracétique) 2 % pour éliminer les cations divalents, qui se combinent aux nucléoside-polyphosphates. On rince avec 1 ml d'eau distillée.

On désactive partiellement le mélange adsorbant par passage de 5 ml d'une solution d'octanol 8 % (en volume) dans l'éthanol.

On fait passer sur la colonne une quantité d'extrait contenant environ une μ mole de composés adsorbables et on lave avec 1 ml d'eau distillée. Sont retenus : les bases, nucléosides et nucléotides, y compris le NAD et le NADP. Passent dans le filtrat le Glucose-1-P, le Glucose-6-P, les esters phosphoriques et le phosphate minéral.

On élue ensuite par 6 ml de pyridine 50 %. L'éluat est évaporé à sec au moyen d'un courant d'air filtré. A chaque stade, on règle la pression d'air comprimé de façon à obtenir un débit voisin de 3 ml/heure.

c) Chromatographie sur papier

On utilise du Whatman n° 1 préalablement débarrassé de ses cations divalents. Pour cela, le papier est trempé pendant 6 heures dans une solution de Versène à 2 g par litre, neutralisée à raison de 10 litres pour 50 feuilles de papier environ. On le rince six fois à l'eau distillée et on sèche sur une surface propre et lisse.

Selon EGGLESTON et HEMS (52), ce traitement du papier par le Versène, qui élimine les impuretés métalliques, rend les taches de chromatographie plus compactes et supprime les traînées qui pourraient gêner la résolution chromatographique.

On dépose la solution contenant les nucléotides au moyen d'une seringue micrométrique "Agla" (Burroughs Wellcome and Co) par fraction de 10 μ l en séchant le papier au fur et à mesure par un courant d'air chaud, sans dépasser 30°. Le système solvant est celui de KREBS et HEMS (53).

Acide isobutyrique : 10 volumes

NH₄OH N : 6 volumes

La migration dure environ 24 heures.

Les adénosine-nucléotides, L'IMP et le NAD sont nettement séparés. En revanche, l'inosine a un R_f identique à celui de l'AMP, ce qui n'est pas une cause d'erreur, puisque nous dosons les nucléotides par le phosphore qu'ils contiennent.

Pour séparer les nucléotides uridyliques, guanyliques et cytidyliques, on pratique une chromatographie à deux dimensions : la première dimension avec le solvant ci-dessus et la deuxième

avec un des solvants de HANES et ISHERWOOD (54) :

n-propanol	6 volumes
NH ₄ OH concentré	3 volumes
H ₂ O	1 volume

Le développement dure 48 heures. La carte chromatographique est représentée dans la figure 2.

Les R_f relatifs, par rapport à l'AMP sont donnés dans le tableau I.

Les nucléotides sont repérés en éclairant le papier au moyen d'une lampe à rayons ultraviolets courts ($\lambda = 258 \text{ m}\mu$) : ils se détachent en sombre sur la fluorescence du papier. On les cercle au crayon.

L'identification des nucléotides a été réalisée en présence de témoins latéraux et internes sur les chromatogrammes. De plus, chaque nucléotide, après élution de la tache chromatographique par une solution d'ammoniaque N/10, a été identifié par spectrophotométrie dans l'ultra-violet (spectrophotomètre Beckmann D.U).

d) Minéralisation et dosage

On découpe les fragments de papier supportant les nucléotides et on les place dans des matras à minéraliser, puis l'on ajoute :

0,3 ml d'H₂SO₄ concentré

0,2 ml d'HClO₄ 60 %

0,3 ml d'une solution de molybdate d'ammonium 2,5 %, pour catalyser la minéralisation.

FIGURE 2

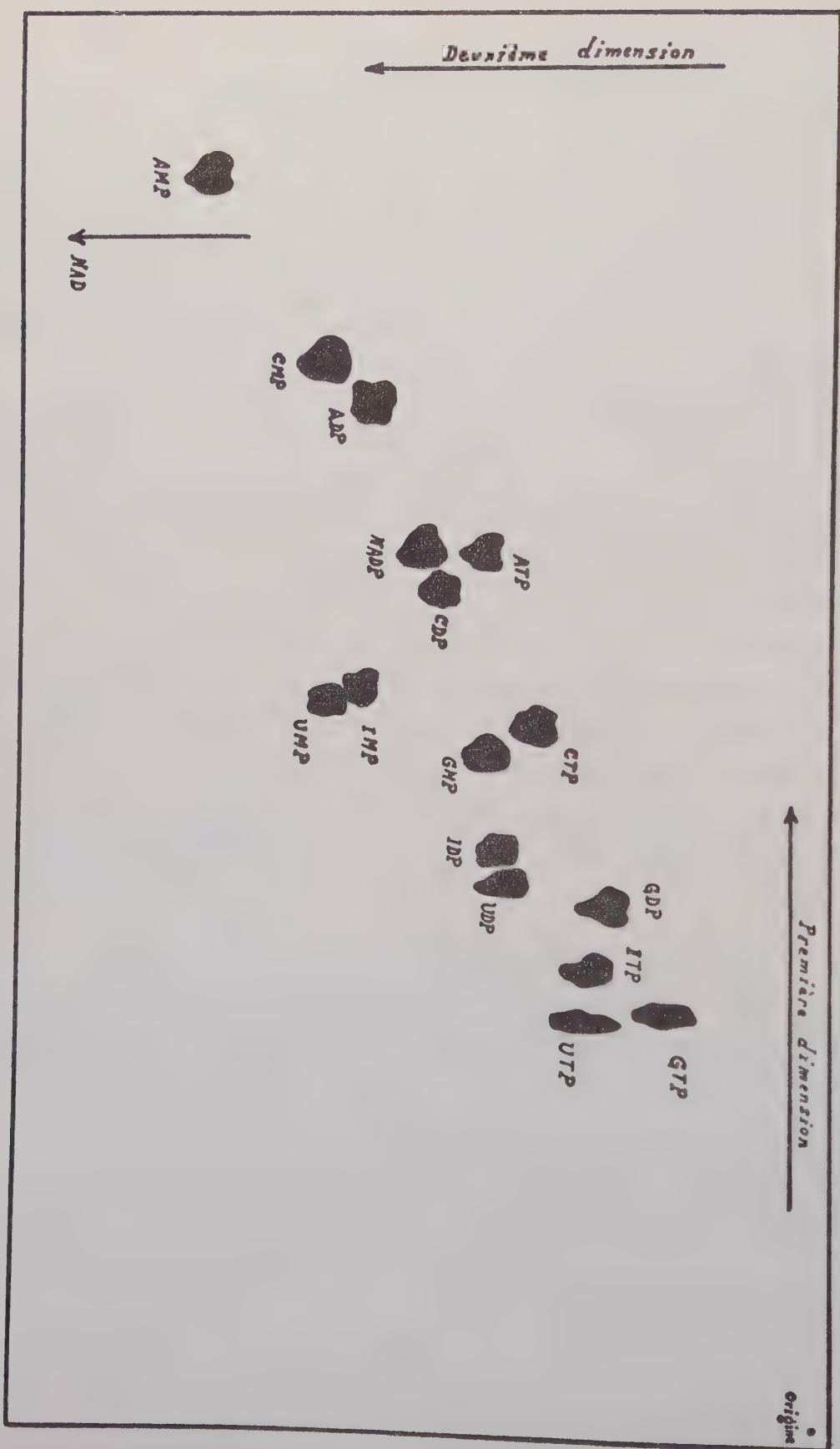


TABLEAU I

Nucléotides	Rf relatifs à celui de l'AMP			
	Solvant 1 ^{re} dimension			Solvant 2 ^e dimension
	KREBS et HEMS	VOLFIN et coll.	Résultats personnels	Résultats personnels
AMP	1,00	1,00	1,00	1,00
ADP	0,80	0,82	0,80 - 0,84	0,73
ATP	0,66	0,65	0,65 - 0,73	0,55
NAD		0,87	0,87 - 0,92	*
NADP		0,58	0,70	0,65
GMP		0,54	0,54	0,54
GDP		0,41	0,42	0,35
GTP		0,27	0,28 - 0,30	0,26
CMP			0,85	0,81
CDP		0,62	0,67	0,62
CTP		0,46	0,56	0,47
UMP			0,58	0,79
UDP		0,40	0,44	0,51
UTP		0,27	0,33	0,38
IMP	0,53	0,57	0,59	0,75
IDP	0,39		0,46	0,52
ITP	0,26		0,37	0,37

* En 2^e dimension, le NAD est entraîné avec le solvant.

On chauffe doucement jusqu'au démarrage de la réaction, puis plus fort jusqu'à décoloration puis recoloration en jaune du mélange.

Le phosphate est dosé par la méthode de BERENBLUM et CHAIN (55) ; dans cette méthode, on fait le complexe phosphomolybdique que l'on extrait par l'isobutanol à pH inférieur à 1, ce qui permet d'éliminer les impuretés, les oxydants qui gêneraient la réduction et augmente la sensibilité (0,25 à 15 μ g).

Dans une ampoule à décantation de 25 ml, on met :

2,5 ml de solution aqueuse de molybdate
d'ammonium 2,5 %

8 ml d'isobutanol redistillé

le contenu minéralisé du matras, rincé avec 4,
puis 3 ml d'eau distillée.

L'acide sulfurique employé pour la minéralisation suffit à amener le pH à une valeur convenable ; si l'on opère sur une solution insuffisamment acide (solution standard de phosphate, par exemple), on ajoute 0,25 ml d'acide sulfurique concentré.

On extrait l'acide phosphomolybdique en agitant les ampoules 30 secondes, et on élimine la couche inférieure. Puis on lave deux fois avec 5 ml d'acide sulfurique normal chaque fois, en jetant la couche aqueuse.

On transfère la phase isobutanolique dans un tube gradué en rinçant l'ampoule avec de l'éthanol 95° et on ajuste à 10 ml avec de l'éthanol.

On réduit le contenu de chaque tube en ajoutant 0,1 ml d'une solution de SnCl_2 à 40 % (10 g dans 25 ml d'HCl concentré).

On agite et on lit au photomètre à 680 m μ .

On fait un blanc en introduisant, dans une ampoule à décanter, 6,5 ml d'eau, en présence de 0,5 ml, du mélange minéralisant afin d'obtenir un pH acide.

On prépare un standard à 10 μ g de phosphore par ml, par dilution d'une solution mère de phosphate monopotassique (KH_2PO_4) à 0,4389 g/l (100 μ g de phosphore par ml). On utilise 1 ml standard à 10 μ g acidifié, dans une ampoule à décantation, par 0,5 ml du mélange minéralisant et auquel on ajoute 6 ml d'eau.

Un blanc-papier est aussi préparé, à partir du chromatogramme, pour soustraire des valeurs obtenues le phosphore contenu dans le papier.

e) Dosage d'ATP par luminescence

Nous avons également utilisé, pour les dosages d'ATP à partir des tissus, une méthode qui met à profit l'existence d'une relation linéaire, entre la quantité d'ATP ajoutée à un extrait d'organes lumineux d'insectes "Photinus Pyralis" et la luminescence produite par cet extrait après addition d'ATP (56, 57).

L'extrait à doser est préparé selon le protocole précédemment décrit.

Préparation de l'extrait enzymatique de Photinus Pyralis

On broie rapidement dans un mortier environ 25 organes lumineux de Photinus Pyralis, en présence de 10 ml de tampon arséniate de Na 0,1 M de pH 7,4 à 0°. On centrifuge le broyat à 0° pendant 20 minutes. On recueille le surnageant et on y dissout 100 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Cette préparation, conservée à la glacière à 0°, reste active plusieurs jours. Une légère précipitation d'arséniate de Mg^{++} ne perturbe pas le dosage si la suspension est maintenue homogène.

Dosage

Dans une cuve à faces parallèles, on met dans l'ordre : 0,1 ml d'extrait enzymatique de *Photinus Pyralis*, une quantité adéquate de tampon arséniate de Na 0,1 M à pH 7,4 (on opère toujours de façon à avoir un volume final de 1 ml). On mélange avec un agitateur de verre. On introduit rapidement la cuve dans l'appareil à mesurer la luminescence, et on ajuste le galvanomètre au zéro. On ajoute alors rapidement un volume connu de prise d'essai. On agite à nouveau, de façon à assurer l'homogénéité et l'oxygénation du milieu. On mesure la déviation du galvanomètre 20 secondes après addition de la prise d'essai contenant l'ATP. Pour chaque extrait à analyser, on fait plusieurs mesures avec des volumes différents d'extrait afin de vérifier le caractère linéaire de la relation. On fait aussi chaque fois une courbe étalon avec une solution standard d'ATP.

Appareillage pour la mesure de la luminescence

Nos mesures ont été faites avec un appareil mis au point dans le laboratoire de G.V.R. BORN (Nuffield Institute, Oxford) ; ce montage comporte une cellule photoélectrique reliée à un amplificateur et à un galvanomètre.

Sources d'erreurs au cours du dosage

Signalons les causes d'erreurs les plus importantes. Ce sont : le manque d'oxygène (il suffit d'agiter l'essai pour y remédier), la présence d'anions monovalents qui inhibent le développement de la luminescence, ou des traces d'acide trichloracétique. Le dosage de standards internes permet de contrôler l'absence de ces inhibiteurs.

La mise au point de cette méthode de dosage de l'ATP a été réalisée par D. GAUTHERON au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lyon.

J - MESURE DE LA VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES COMPOSES PHOSPHORYLES DE L'ARTÈRE AU MOYEN DE ³²P

Nos expériences ont été réalisées in vivo (animaux traités par l'adrénaline) et in vitro (animaux normaux et soumis à un régime athérogène).

Au cours d'expériences préliminaires, nous avons étudié l'évolution de la radio-activité totale dans le sang de lapin, ainsi que le pourcentage de phosphate marqué se trouvant dans le sang sous forme minérale, en fonction du temps écoulé après injection intra-veineuse de phosphate radio-actif.

Les animaux sont sacrifiés par décapitation à des temps variables (10, 20 et 30 minutes) après l'injection du phosphate marqué (50 μ C). Le sang est recueilli sur une goutte d'héparine. On met 0,1 ml de sang dans 10 ml de TCA à 10 % en dispersant bien le caillot avec un agitateur et on centrifuge à 8.000 g pendant 10 minutes.

Pour le dosage du phosphate minéral du sang, 5 ml de cet extrait sont mis dans une ampoule à décantation avec 2,5 ml de molybdate d'ammonium 2,5 %, 2 ml d'eau distillée et 8 ml d'isobutanol. Le dosage est poursuivi comme précédemment sur la phase isobutanolique.

Les expériences in vivo ont été conduites selon le protocole suivant :

a) Incubations

Les lapins consanguins reçoivent 23 μ g de l-adrénaline par kg de poids en injection intra-veineuse. Ils sont tués par fracture de la colonne cervicale et saignés. Les aortes sont disséquées sur tablette refroidie, soigneusement séchées sur papier filtre, pesées, ouvertes longitudinalement et mises à incuber dans des erlenmeyers de 25 ml.

Nous avons utilisé le bain-marie et le système d'agitation d'un appareil de Warburg. Un dispositif spécial s'appuyant sur les porte-manomètres maintient les erlenmeyers dans le bain-marie. La saturation en O_2/CO_2 (95 %/5 %) est maintenue par un courant gazeux passant dans les erlenmeyers qui sont munis de bouchons à double ouverture. Les incubations sont réalisées à 38°, à pH 7,3, soit en milieu sérum (atmosphère O_2 pur) soit en milieu Krebs Ringer bicarbonate de sodium (atmosphère O_2/CO_2). Les erlenmeyers, sous courant gazeux, sont mis au thermostat pendant 5 minutes avant l'introduction du tissu ; on poursuit l'équilibration thermique, sous courant gazeux, pendant 5 minutes. On introduit alors 0,1 ml d'une solution de $Na_2H^{32}PO_4$ (20 μ C) dans $NaCl/NaHCO_3$ isotonique (temps zéro). Le volume total est de 10 ml.

Au bout de 2, 5 ou 10 minutes, l'aorte est retirée, soigneusement séchée puis broyée à 0° en présence de TCA 10 % (10 ml/g) dans un homogénéiseur Biorex H 45. Le broyat est centrifugé 15 minutes à 0°, à 20.000 g. Le liquide surnageant est l'extrait brut.

b) Evaluation de l'activité spécifique des différentes fractions

La méthode employée a été mise au point par H. CLAUSER, D. EBOUE BONIS, D. GAUTHERON, F. MATRAY et P. VOLFIN (Labor. Chimie Biol., Faculté des Sciences, 96, Bd Raspail, Paris).

Le phosphate est dosé par la méthode de CHAIN et BERENBLUM (55) et des parties aliquotes sont comptées après séchage sous lampe infra-rouge, avec un compteur Geiger.

1 - Phosphate minéral et phosphocréatine

Il s'agit ici du phosphate minéral vrai du tissu ; quant à la fraction dite "phosphocréatine", elle représente la somme des esters très labiles rapidement hydrolysés en milieu acide. Elle est essentiellement constituée par de la phosphocréatine.

1,5 ml de l'extrait brut maintenu à 0° est introduit dans un tube contenant 0,5 ml de molybdate d'ammonium 2,5 p. 100 et 1,5 ml d'isobutanol saturé d'eau et préalablement refroidis. On agite pendant 30 secondes et on prélève immédiatement la couche d'isobutanol qui contient le phosphate minéral de l'extrait tandis que la phosphocréatine reste dans la phase aqueuse. L'emploi de mélanges de phosphate minéral radio-actif (^{32}P) et de phosphocréatine non marquée a permis de vérifier que dans ces conditions, tout le phosphate minéral est extrait par l'isobutanol alors que la phosphocréatine reste dans la couche aqueuse. Pour doser la phosphocréatine on abandonne à la température ordinaire cette couche aqueuse (dont le pH est voisin de 1) pendant une heure.

Cette opération provoque l'hydrolyse totale de la phosphocréatine sans cependant hydrolyser les composés suivants : phosphoénol pyruvate, nucléotides polyphosphates, glucose-1-phosphate et fructose 1,6 - diphosphate.

On extrait alors le phosphate ainsi libéré par de l'isobutanol. Le phosphate est estimé et compté dans les deux fractions d'isobutanol.

2 - Phosphore total acido-soluble

Le dosage est effectué sur l'extrait brut ayant subi une minéralisation sulfoperchlorique. On compte directement l'extrait brut.

3 - Phosphate minéral extracellulaire et intracellulaire

On admet que le phosphate minéral extracellulaire est en équilibre avec le phosphate du milieu d'incubation. On dose et on compte donc le phosphate du milieu d'incubation après déprotéinisation par l'acide trichloracétique 10 p. 100 (concentration finale), ce qui donne le phosphate extracellulaire.

Le phosphate minéral intracellulaire peut être calculé si l'on connaît l'espace extracellulaire du tissu.

Il est égal à la différence entre le phosphate minéral total (voir 1) et le phosphate extracellulaire, compte tenu de l'espace mesuré. Pour des temps courts d'incubation, l'activité spécifique du phosphate intracellulaire est très faible par rapport à celle du phosphate extracellulaire ; l'erreur peut être très grande. La valeur de l'espace extracellulaire doit être évaluée rigoureusement pour diminuer l'erreur.

4 - Phosphore résiduel

Le filtrat sortant de la colonne de charbon, qui ne contient plus de nucléotides, est additionné de 1 ml d'HCl concentré et de 0,5 ml de molybdate d'ammonium 2,5 p. 100

puis abandonné pendant 3 heures à la température ordinaire, pour que la phosphocréatine soit totalement hydrolysée. On élimine ensuite le phosphate minéral par quatre extractions à l'isobutanol.

L'extrait ainsi débarrassé des nucléotides, du phosphate minéral et de la phosphocréatine, est minéralisé par le mélange sulfoperchlorique ; on dose et on compte le phosphore qui constitue le phosphore résiduel.

5 - Nucléotides

Une partie aliquote de l'extrait brut, débarrassé du TCA qu'elle contient, est adsorbée sur colonne de charbon, éluée par la pyridine puis chromatographiée selon le protocole décrit précédemment.

L'activité spécifique des nucléotides est déterminée de la façon suivante :

chaque chromatogramme est effectué en double ; l'un sert au dosage des nucléotides. Sur l'autre, les nucléotides sont élués chromatographiquement au moyen d'une solution d'ammoniaque N/10, directement dans les cupules de comptage. Après chaque élution, on vérifie que celle-ci est complète en soumettant le papier à une irradiation U.V. (à 258 mμ).

Les comptages sont effectués au moyen d'un compteur à fenêtre ultra-mince Tracerlab, sous courant gazeux, sous une tension de 1250 volts qui correspond au milieu du plateau du tube. Les solutions à compter sont évaporées à sec dans des cupules en verre circulaires, à fond plat, au moyen d'une lampe à infra-rouge.

Il n'est pas possible d'évaporer ainsi les solutions isobutanoliques d'acide phosphomolybdique, car l'alcool mouille

suffisamment le verre pour, sous l'action de la chaleur, remonter le long des parois et se répandre en dehors de la cupule. On doit donc évaporer l'isobutanol sous un courant d'air filtré à froid ; après dessiccation, on reprend le résidu par de l'eau distillée et l'on évapore cette nouvelle solution dans les cupules.

Les bilans effectués à la fin de chaque expérience nous ont donné, de façon constante , des récupérations de phosphate et de radioactivité identiques et voisines de 100 % (95 - 110 %), ce qui montre qu'il n'y a ni perte de composés phosphorylés au cours des séparations, ni absorption notable de radioactivité lors des comptages.

K - MESURES MANOMETRIQUES

1 - Mesures de consommation d'oxygène

Les mesures sont faites selon la technique manométrique de Warburg, à 38°.

Le Q_{O_2} est défini par la formule :

$$Q_{O_2} = \frac{\mu l O_2 \text{ consommé}}{\text{mg de poids sec} \times t}$$

(t = durée de la mesure exprimée en heures)

Les temps sont comptés à partir de la première mesure.

Dans toutes les expériences, les fioles contenant leurs réactifs et reliées à leurs manomètres sont placées dans le thermostat à 38°, agitées et mises sous courant gazeux 10 minutes avant addition de l'organe. Après addition de celui-ci, on continue le passage gazeux pendant 5 à 8 minutes environ. On ferme alors les manomètres et la première mesure a lieu dans tous les cas 20 minutes après le sacrifice de l'animal.

Les mesures sont faites dans des fioles coniques à puits central et à une ampoule latérale, en atmosphère d'oxygène pur. Le milieu tampon utilisé est un "Krebs-Ringer au phosphate de sodium" (58).

Les fioles contiennent 2 ml de milieu tampon, sauf indication contraire, et dans le puits central 0,2 ml de KOH 3 N. On augmente la surface de contact entre l'atmosphère et la potasse par adjonction d'un fragment de papier filtre.

Les substances ajoutées éventuellement sont dissoutes dans le milieu tampon et l'on s'assure que, après mélange, le pH est bien de 7,1.

A la fin de toutes les mesures, on contrôle que le pH n'a pas varié au cours de l'expérience.

2 - Mesures des phosphorylations oxydatives

Les mesures de rapports P/O ont été effectuées, non pas à partir de suspensions mitochondriales, mais à partir d'homogénats d'aorte et de foie. En effet, en ce qui concerne le tissu aortique, il ne nous a pas été possible de préparer des mitochondries, ceci en raison de difficultés d'ordre technique. En dehors du fait qu'une telle préparation aurait exigé un matériel biologique de départ quantitativement très important (une vingtaine d'aortes au minimum), le broyage mécanique initial du tissu aortique n'aurait pas permis de conserver l'intégrité structurale des membranes mitochondriales, indispensable à leur activité biologique, comme nous l'ont confirmé de nombreux essais préliminaires, effectuées sur des aortes isolées.

Les aortes et les foies sont homogénéisés, sitôt prélevés, en présence de saccharose 0,25 M (9 volumes) à 0° à l'aide d'un appareil de POTTER-ELVEHJEM. La consommation d'oxygène est

mesurée par la méthode directe de WARBURG à 30°, en présence d'air et de KOH 20 % pour absorber le CO₂. Les homogénats sont ajoutés sous un volume de 0,2 ml (foie) ou de 0,5 ml (aorte) dans la cavité réactionnelle contenant du milieu décrit par WOLLEMAN et KOC SAR (59).

Pour un volume final de 3 ml, la composition du milieu est la suivante :

Glycylglycine Na pH 7,4	$1,5 \cdot 10^{-2}$ M
Tampon phosphate pH 7,4	$2 \cdot 10^{-2}$ M
Glucose	$3 \cdot 10^{-2}$ M
KCl	$5 \cdot 10^{-2}$ M
MgCl ₂	$5 \cdot 10^{-3}$ M
ATP	$2,5 \cdot 10^{-3}$ M
Cytochrome C oxydé	$5 \cdot 10^{-5}$ M
Pyruvate	$1 \cdot 10^{-2}$ M
Malate	$1 \cdot 10^{-2}$ M
NAD	$5 \cdot 10^{-4}$ M
NaF	$1 \cdot 10^{-2}$ M
EDTA	$1 \cdot 10^{-3}$ M

Au temps zéro des mesures, après 10 minutes de préincubation, on ajoute par l'ampoule latérale 0,2 ml d'une solution d'hexoKinase (2 mg). Le pH final est contrôlé pour chaque essai et se trouve toujours compris entre 7 et 7,3. Pour chaque essai on opère avec des fioles réactionnelles identiques. Au temps zéro des mesures, on arrête la réaction dans une des cellules par addition de TCA 50 % (concentration finale 10 %) pour doser le phosphate. Simultanément l'HexoKinase est introduite dans les autres cellules. A la fin des mesures (15 minutes pour le foie, 30 minutes pour l'aorte), on arrête la réaction par addition de TCA 50 % pour doser le phosphate.

Un essai contrôle (thermobaromètre) est effectué avec une partie aliquote d'homogénat bouilli. Les milieux réactionnels, additionnés de TCA, sont centrifugés à 0° pendant 10 minutes (10.000 g). Le phosphate est dosé par la méthode de FISKE et SUBBAROW (60).

Le P/O est égal au rapport entre le nombre de μ atomes de Pi et le nombre de μ atomes d'oxygène consommés pendant le temps de la réaction.

Les protéines de l'homogénat sont dosées par la méthode du Biuret (61) modifiée par SLATER (62) ou par la méthode du Biuret "rapide" (63).

a) Dosage des phosphates (FISKE et SUBBAROW)

La méthode est basée sur la formation du complexe phosphomolybdique qui donne par réduction un composé de couleur bleue dosé colorimétriquement à 700 m μ (spectrophotomètre Coleman Junior).

Le phosphate minéral est transformé en acide phosphomolybdique dans l'acide sulfurique 10 N. On met dans l'ordre :

0,4 cm³ H₂SO₄ 10 N

0,8 cm³ de molybdate d'ammonium 2,5 p. 100

0,4 cm³ de réactif de FISKE et SUBBAROW, 10 minutes

après.

On complète à 10 cm³ avec de l'eau distillée. On laisse la réaction se développer 30 minutes et on fait les lectures à 700 m μ .

Un blanc réactif, des étalons internes et une courbe étalon (5 à 40 μ g de P) sont préparés en même temps et dosés dans les mêmes conditions que les dosages effectués sur les liquides

surnageants provenant des milieux d'incubation.

Nous avons utilisé pour la préparation du réducteur du Rhodol ou sulfate de monoéthyl-p-aminophénol (Prolabo).

b) Méthode du Biuret préconisée par SLATER

A $0,1 \text{ cm}^3$ d'homogénat est ajouté $0,1 \text{ cm}^3$ de TCA 10 %. On centrifuge 15 minutes à 9.000 g. On jette le surnageant et on reprend le culot par 2 cm^3 d'alcool à 50° et une goutte de TCA 50 %. On agite et on centrifuge 10 minutes à 9.000 g. On jette le surnageant et on reprend le culot par 2 cm^3 d'alcool à 96° . On agite et on centrifuge 10 minutes à 9.000 g. On jette le surnageant.

On ajoute au culot $0,9 \text{ cm}^3$ d'eau distillée. Conjointement 4 tubes contenant respectivement 0,2, 0,4, 0,6 et 0,8 cm^3 d'une solution étalon d'ovalbumine à 5 mg par cm^3 sont complétés à 1 cm^3 avec de l'eau distillée. On ajoute dans tous les tubes 4 cm^3 de réactif du biuret. On laisse la coloration se développer 24 heures à l'abri de la lumière. On lit à 540 m μ (spectrophotomètre Coleman Junior).

c) Méthode du Biuret "rapide"

Cette méthode présente l'avantage sur la précédente de doser très rapidement la teneur en protéines du milieu. Il est ainsi possible d'ajuster à une valeur constante cette dernière.

A une prise d'essai de $0,4 \text{ cm}^3$ de l'homogénat est ajouté $0,2 \text{ cm}^3$ d'une solution de cholate de sodium à 4% (préparée extemporanément. On attend 2 minutes. On ajoute NaOH 10 % q.s.p. 3 cm^3 compte tenu du volume de CuSO_4 ajouté ensuite. On ajoute enfin $0,3 \text{ cm}^3$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 1 %.

Conjointement un blanc réactif et une courbe étalon portant sur des prises d'essai de 0,2, 0,4, 0,6 et 0,8 cm³ d'une solution d'ovalbumine à 5 mg par cm³ sont effectués.

On lit immédiatement à 540 mμ (Spectrophotomètre Coleman Junior).

L - CALCULS STATISTIQUES

Afin d'apprécier la précision de nos résultats, nous avons procédé à leur analyse statistique.

Les formules que nous avons utilisées au cours de ce travail sont rappelées ci-dessous :

- Moyenne arithmétique : Les moyennes indiquées dans nos tableaux sont des moyennes arithmétiques, obtenues en divisant la somme des valeurs individuelles par le nombre des observations.

- Erreur standard sur la moyenne : l'erreur standard sur la moyenne indique avec quelle précision la moyenne a été déterminée. Elle est définie par la formule :

$$M = \sqrt{\frac{\sum (x - M)^2}{N (N - 1)}}$$

où

x = une valeur individuelle

M = la moyenne arithmétique des valeurs

N = le nombre des observations.

- Différence significative : la formule de STUDENT permet d'apprécier si une différence entre deux moyennes est

significative ou due au hasard.

Formule de STUDENT : $t = \frac{M_1 - M_2}{S} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}}$

où

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - M_1)^2 + \sum (x - M_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

M_1 et M_2 sont les moyennes des observations des groupes 1 et 2.
 N_1 et N_2 représentent le nombre des observations pour les groupes 1 et 2.

"t" permet de comparer les deux moyennes en fonction de leur déviation standard ; connaissant "t", on trouve dans les tables de FISCHER la probabilité P avec laquelle la différence observée peut être due au hasard.

Nous considérons qu'une différence entre deux moyennes est statistiquement significative, ou plus simplement significative, lorsque P est inférieur à 0,05.

Si P est compris entre 0,05 et 0,1, la différence est probablement significative, mais, pour l'affirmer, il faut augmenter le nombre des observations.

Enfin, si P est supérieur à 0,1, la différence est probablement due au hasard.

Analyse de Variance : test F

L'analyse de variance consiste essentiellement à décomposer la variance totale d'un ensemble en variances partielles, correspondant à des sources de variation différentes et déterminées. Ces variances sont ensuite comparées entre elles au moyen d'un test appelé test F. La variance, qui est une mesure de la dispersion,

s'obtient en divisant la somme des carrés par le nombre de degrés de liberté.

Le test F, dont le principe détaillé est décrit par LISON (64), permet de comparer deux séries de mesures. Cette comparaison se fait en testant l'hypothèse nulle, c'est-à-dire l'hypothèse que les deux séries ont été tirées d'une population unique. Si l'hypothèse est contredite par le test, on conclut que les deux séries sont différentes. Comme pour le test t, la distribution de fréquence des valeurs de F, connue exactement par les travaux de FISCHER, est donnée dans des tables.

Pour les deux séries de mesures A et B, la conduite des calculs est la suivante :

I Les calculs préliminaires

On doit avoir

1°) la somme des données pour chaque série (SXA, SXB) et le total général pour les deux données

$$SX = SXA + SXB$$

2°) la somme des carrés des données SX^2A , SX^2B et leur total général

$$SX^2 = SX^2A + SX^2B$$

3°) le "Terme de correction" C, obtenu en divisant le carré de la somme totale des données $(SX)^2$ par le nombre total de données ($n = nA + nB$).

$$C = \frac{(SX)^2}{n}$$

II Variation totale, Sx^2_f

La somme des carrés pour la variation totale est obtenue en prenant la somme totale des carrés des données SX^2 et en soustrayant le terme de correction C.

$$Sx^2_f = SX^2 - C$$

Le nombre de degrés de liberté, DL, correspondants est égal au nombre total de données moins un.

$$DL = (nA + nB) - 1$$

III Variation entre groupes. Sx^2_E .

La somme des carrés s'obtient de la manière suivante : On élève au carré la somme des données relatives au premier groupe A et divise par le nombre de données contenues dans ce groupe, on procède de même pour l'autre groupe B, on fait la somme de ces valeurs et soustrait le terme de Correction.

$$\text{Somme des carrés} = Sx^2_E = \frac{(SXA)^2}{nA} + \frac{(SXB)^2}{nB} - C$$

Le nombre de degrés de liberté, DL, est égal au nombre de groupes moins un.

IV Variation à l'intérieur des groupes Sx^2_I

La somme des carrés s'obtient en prenant la somme totale du carré des données SX^2 et en soustrayant le premier terme du calcul fait pour la variation entre groupes.

Le nombre de degrés de liberté est égal à la somme du nombre des données de chaque groupe, diminué chaque fois de un.

$$DL = (nA - 1) + (nB - 1)$$

$$\text{Sommes des carrés } Sx^2 I = Sx^2 - \left[\frac{(SXA)^2}{nA} + \frac{(SXB)^2}{nB} \right]$$

Il reste à calculer le rapport de variance F. Pour cela, on calcule les carrés moyens (ou variances) pour les différentes sources de variation, en divisant les sommes des carrés par les degrés de liberté correspondants.

La valeur de F s'obtient en faisant le rapport des deux carrés moyens, en plaçant au Numérateur le carré moyen le plus élevé. Il suffit alors de se reporter aux tables de F, indiquant les valeurs critiques de F pour les limites de probabilité de 5 % et de 1 %, seules utilisées dans la pratique. Si la valeur de F trouvée est comprise (ou supérieure) entre les valeurs critiques pour les deux seuils de probabilité $F = 0,05$ et $F = 0,01$, on conclut que la différence observée entre les deux groupes A et B est significative, c'est-à-dire que la valeur de F trouvée est supérieure à la limite de probabilité $P = 0,05$ et inférieure à la limite $P = 0,01$.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES DANS LE TISSU AORTIQUE

1 - ACTION DE CERTAINS EFFECTEURS SUR L'INCORPORATION "IN VITRO" D'ACIDES AMINES MARQUES DANS LES PROTEINES

Lorsque en 1960, nous avons abordé, l'étude de l'action "in vitro" de certains composés biologiques sur la biosynthèse des protéines, on ne disposait alors que de données encore fragmentaires sur son mécanisme intime. Pour pouvoir juger de l'action de certains effecteurs sur l'incorporation "in vitro" d'acides aminés marqués par le carbone ^{14}C dans les protéines ribosomales, nous avons utilisé la technique de KELLER et ZAMECNIK (26) faisant appel au système de HOAGLAND, développé par cet auteur dès 1954 (65, 66).

Le principe que nous rappellerons brièvement repose sur l'incubation, en présence de cofacteurs et d'un acide aminé radio-actif, de deux fractions sub-cellulaires : une fraction particulière ribosomale et les enzymes d'activation de la fraction soluble.

Trois composés ont été étudiés : le glutathion, le phosphate de pyridoxal et la thyroxine. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau II.

T A B L E A U I I

INCORPORATION IN VITRO DE ^{14}C LEUCINE DANS LES PROTEINES RIBOSOMALES DU FOIE ET DE L'ARTÈRE : influence du Glutathion, de la l-Thyroxine et du Phosphate de Pyridoxal.

ORGANES	EFFECTEURS	CONTROLES	ESSAIS EN PRESENCE D'EFFECTEURS	VALEUR de P
FOIE	GSH	595,2 $\pm$ 35,3	756,6 $\pm$ 48,7	P = 0,01
	THYROXINE	360,2 $\pm$ 40,3	482,5 $\pm$ 32,3	P = 0,01
	PYRIDOXAL	340,1 $\pm$ 29,4	329,4 $\pm$ 26,5	P > 0,05
ARTÈRE	GSH	318,6 $\pm$ 41,5	425,5 $\pm$ 37,1	0,05 > P > 0,01
	THYROXINE	278,3 $\pm$ 38,5	339,7 $\pm$ 35,1	P > 0,05
	PYRIDOXAL	252,1 $\pm$ 46,2	270,5 $\pm$ 39,5	P > 0,05

Les valeurs moyennes, exprimées en nombre de coups/minute/mg de Protéines, sont suivies de l'erreur-type. (5 cas).

a) Glutathion

Le rôle du glutathion était particulièrement étudié à l'époque où nous avons envisagé son action, en raison de la découverte des enzymes d'activation et de la présence probable d'un groupe thiol au niveau de leur centre actif.

Au cours d'une série d'essais, nous avons introduit dans le milieu d'incubation, outre les cofacteurs ATP, système générateur d'ATP et GTP, du glutathion réduit, à différentes concentrations.

Comme le montre le Tableau II, nous avons observé un effet de stimulation statistiquement significatif du glutathion sur le transfert de ^{14}C leucine dans les protéines ribosomales du tissu hépatique et du tissu aortique. Ces résultats obtenus avec le système de KELLER et ZAMECNIK, sont en accord avec ceux de LIPMANN et coll. (67) et de HULSMANN et LIPMANN (68). Ils témoignent d'une stimulation liée à la présence du groupement thiol. Au cours d'essais parallèles effectués en l'absence de glutathion, nous avons noté une plus faible activité enzymatique, mais si celui-ci est ajouté au temps zéro, le taux de transfert augmente avec le temps. On observe des résultats similaires avec le mercaptoéthanol. Différents auteurs, dont ALLEN et coll. (69), ont d'ailleurs rapporté l'effet protecteur du glutathion réduit ou du mercaptoéthanol sur l'activité de plusieurs enzymes d'activation.

b) Le phosphate de pyridoxal

Parallèlement, nous avons conduit une série d'expériences avec le phosphate de pyridoxal, dérivé physiologiquement actif de la vitamine B_6 . Comme en témoignent les résultats rapportés dans le tableau II nous n'avons noté aucune stimulation significative du transfert de la ^{14}C leucine dans les ribosomes en présence

de ce composé. Ce fait est en accord avec les résultats de LICHSTEIN (70). Selon cet auteur le phosphate de pyridoxal ne ferait que favoriser la pénétration des acides aminés à travers la membrane cellulaire.

c) La thyroxine

Le tableau II montre que la thyroxine a une action sur l'activation de la ^{14}C leucine au niveau des protéines ribosomales du foie, mais qu'elle n'a pas d'effet significatif sur le transfert de cet acide aminé dans les ribosomes de l'aorte. En ce qui concerne le tissu hépatique, nos résultats sont corroborés par ceux de SOKOLOFF et coll. (71) qui ont montré que la thyroxine stimule "in vivo" et "in vitro" l'incorporation d'acides aminés dans les protéines microsomales d'homogénats de foie de rat. Nous avons personnellement observé les mêmes effets "in vitro" à partir d'homogénats de foie, chez le lapin. Des travaux ultérieurs, dus en particulier à ROCHE et coll. (72), ont d'ailleurs démontré que l'action de la thyroxine sur l'incorporation sélective d'acides aminés dans les protéines d'homogénats de foie porte principalement sur leur transport par l'ARN soluble.

2 - INCORPORATION D'ACIDES AMINES MARQUES DANS LES PROTEINES DU TISSU AORTIQUE ET HEPATIQUE

Notre expérimentation a porté sur l'étude comparative de l'incorporation "in vitro" d'acides aminés radio-actifs dans les systèmes cellulaires (fragments d'aortes entières et coupes de tissu hépatique) et acellulaires (homogénats d'aorte et de foie).

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus, en utilisant les différentes techniques décrites au chapitre précédent (voir paragraphe F) se trouve résumé dans les tableaux III à VIII

a) Systèmes cellulaires : on incube les aortes entières (intima + média) en présence de leucine, proline et glycocolle radio-actifs.

T A B L E A U I I I

RADIO-ACTIVITE RETROUVEE DANS L'AORTE DE LAPIN APRES INCUBATION
D'ACIDES AMINES MARQUES.

Résultats exprimés en cp/mn/mg de protéines

INCUBATIONS EN PRESENCE DE	ATMOSPHERE O ₂ /CO ₂	ATMOSPHERE N ₂ /CO ₂
DL-Leucine-1 ¹⁴ C	397,6 ± 17,1	392 ± 14,7
DL-Proline-1 ¹⁴ C	389,0 ± 27,4	396 ± 23,5
Glycocolle-1 ¹⁴ C	133,0 ± 14,5	129 ± 14,6

Moyenne de 6 expériences suivies des écarts types.

Comme le montre l'étude du tableau III le taux de radio-activité retrouvé dans les aortes est faible pour les trois acides aminés considérés, bien que nous nous soyons placés dans les conditions optima de pH et température, le glycocolle ayant par ailleurs un taux d'incorporation trois fois plus faible que la proline et la leucine.

D'autre part, les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur, que l'on opère en atmosphère d'oxygène ou d'azote. Dans un deuxième temps nous avons étudié l'incorporation de ces trois acides aminés marqués dans un système acellulaire obtenu à partir d'aortes et de foies. Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux IV et V.

b) Systèmes acellulaires : les incubations ont été réalisées en présence de surnageants à 5.000 g obtenus à partir d'homogénats d'aortes (Tableau IV) et de foies (Tableau V).

T A B L E A U IV

ACTIVITE INCORPORATRICE DU SURNAGEANT
à 5.000 g OBTENU A PARTIR D'AORTES

Résultats en cp/mn/mg de protéines

Incubations en présence de	Surnageant 5.000 g	Surnageant 5.000 g ATP, KP, PEP	Surnageant 5.000 g ATP, KP, PEP, GTP, GSH
DL-Leucine-1 ¹⁴ C	136,8 ± 33,8	203,8 ± 42,3	264,0 ± 12,9
DL-Proline-1 ¹⁴ C	122,7 ± 32,1	201,1 ± 38,2	221,2 ± 36,0
Glycocolle-1 ¹⁴ C	59,5 ± 24,2	101,8 ± 27,1	120,8 ± 28,4

Moyennes de 7 expériences, suivies des écarts-types.

TABLEAU V

ACTIVITE INCORPORATRICE DU SURNAGEANT A 5.000 g OBTENU A PARTIR DU FOIE

Résultats en cp/mn/mg de protéines

Incubations en présence de	Surnageant 5000 g	Surnageant 5000 g ATP, KP, PEP	Surnageant 5000 g ATP, KP, PEP, GTP, GSH
DL-Leucine- ^{14}C	396,5 $\pm$ 47,1	565,5 $\pm$ 47,5	616,3 $\pm$ 44,7
DL-Proline- ^{14}C	494,3 $\pm$ 29,0	571,5 $\pm$ 42,4	598,0 $\pm$ 44,4
Glycocolle- ^{14}C	235,6 $\pm$ 44,1	286,3 $\pm$ 48,0	323,6 $\pm$ 40,9

Moyennes de 6 expériences, suivies des écarts types.

Nous avons conduit simultanément trois séries d'expériences.

Dans les deux premières séries, les traceurs ont été incubés d'abord avec les surnageants à 5.000 g seuls, puis en présence d'ATP et d'un système générateur (PEP, KP), car nous avons admis a priori que les extraits aortiques constituaient un milieu pauvre en microsomes par rapport aux extraits acellulaires de foie. Or, PETERSON, KIT et GREENBERG (73, 74), ainsi que SIEKEVITZ (30) puis ZAMECNIK et KELLER (75), ont depuis longtemps démontré l'importance de ces cofacteurs pour l'incorporation des acides aminés dans les protéines.

Dans la troisième série, nous avons introduit dans le milieu d'incubation, outre les cofacteurs, précités, du GTP et du glutathion (forme réduite). En effet, nos essais préliminaires (Tableau II) portant sur l'effet du glutathion sur le transfert d'acides aminés liés à l'acide ribonucléique soluble dans les ribosomes, nous ont incité à adjoindre systématiquement du glutathion au milieu d'incubation.

Si l'on considère les résultats de façon globale et que l'on compare les taux de radio-activité des trois acides aminés dans le précipité trichloracétique du surnageant à 5.000 g, on peut constater dès l'abord, la faible activité du glycocolle par rapport à la proline et à la leucine, qui sont en moyenne deux fois plus actives. On relève d'ailleurs cette plus faible activation du glycocolle dans les deux systèmes, aortique et hépatique (Tableau IV et V).

On note d'autre part, dans le système aortique (Tableau IV), une augmentation constante d'activité du précipité trichloracétique qui atteint 50 p. 100 pour les trois acides aminés, lorsqu'on passe du milieu ne contenant que le surnageant à 5.000 g au milieu contenant de l'ATP et un système régénérateur. En revanche, cette augmentation d'activité est beaucoup moins nette entre le milieu contenant de l'ATP et le système complet. Le système acellulaire du foie (Tableau V) est sensible, également, à l'adjonction de cofacteurs, mais le gain d'activité est moins marqué (de 15 p. 100 pour la proline à 40 p. 100 pour la leucine). Comme pour l'aorte, le système d'incubation complet réunit l'activité maximum.

Enfin, l'activité incorporatrice comparée des deux milieux acellulaires, aortique et hépatique, incubés dans des conditions optimum pour chaque tissu, nous montre que le surnageant à 5.000 g de foie est beaucoup plus actif que la

préparation analogue d'aortes, ce compte tenu des quantités de surnageant de foie et d'aorte (0,2 ml et 4 ml respectivement) introduites lors des incubations.

Cette différence d'activité entre les deux surnageants d'aorte et de foie nous a conduit à déterminer quelle était la fraction sub-cellulaire aortique responsable de cette moindre activité. A cette fin, nous avons effectué une série d'incubations avec des microsomes isolés à partir de tissu aortique et hépatique, en présence soit de surnageant à 105.000 g, soit d'enzymes pH 5, isolées par précipitation à pH 5,2 par l'acide acétique N à partir du surnageant à 105.000 g. Comme en témoignent les expériences rapportées dans le tableau VI, cette différence d'activité est attribuable essentiellement aux différences des fractions microsomales.

T A B L E A U VI

ACTIVITES INCORPORATRICES COMPAREES DES MICROSOMES DE L'AORTE ET DU FOIE.

Résultats en cp/mn/mg de protéines

MICROSOMES DE FOIE		MICROSOMES D'AORTE	
Surnageant 105.000 g	Enzymes pH 5	Surnageant 105.000 g	Enzymes pH 5
969 ± 79,5	1.104 ± 92,0	342 ± 54,2	327 ± 58,6

Les valeurs moyennes (4 cas) sont suivies de l'écart-type.

Ce fait est confirmé par les expériences d'incubations croisées dont les résultats sont rapportés dans le Tableau VII.

T A B L E A U VII

INCUBATIONS CRUISEES DE FRACTIONS MICROSOMALES

Les microsomes d'aorte ont été incubés en présence de surnageant à 105.000 g de foie et inversement. La radio-activité mesurée est exprimée en nombre de coups/mn/mg de Protéines.

MICROSOMES	FOIE	AORTE
Surnageant 105.000 g	AORTE	FOIE
MOYENNES	745 ± 81,7	336 ± 40,9

Les valeurs moyennes (4 cas) sont suivies de l'écart-type.

Si les microsomes de l'aorte forment un système incontestablement moins actif que ceux du foie, il est cependant intéressant de noter que le taux d'incorporation de la ¹⁴C-leucine dans les protéines ribosomales du foie est plus faible en présence de surnageant à 105.000 g d'aortes qu'avec le surnageant analogue de foie. Par ailleurs, si l'activité incorporatrice, vis à vis de la leucine, du système "enzyme pH 5" est plus élevé que celle du surnageant à 105.000 g dans la fraction microsomale du foie, il semble que pour l'aorte ce soit l'inverse.

c) Etude de l'activité incorporatrice de ribosomes de foie préparés par centrifugation en gradient de saccharose

Les travaux de PALADE et coll. (76) ont montré que la synthèse des protéines était étroitement liée à la présence des ribosomes fixés sur les membranes du reticulum endoplasmique (microsomes).

Dès 1962 cependant, un certain nombre d'auteurs (77 à 81) ont mis en évidence, dans de nombreuses cellules animales, des polysomes ou agrégats de ribosomes non liés aux membranes endoplasmiques. Ceci a été démontré en particulier pour la synthèse d'hémoglobine chez le lapin dans les réticulocytes.

Nous avons eu l'occasion, dans le cadre de notre travail, au cours d'un stage effectué en 1964 au Rockefeller Institute dans le Service du Professeur LIPMANN à New-York, d'étudier l'activité incorporatrice de ribosomes de foie, préparés sans utilisation de détergents, selon la technique de BLOEMENDAL (28). Les résultats de cette expérimentation sont représentés dans le tableau VIII.

Les propriétés de ces ribosomes ont été étudiées essentiellement par l'incorporation de ^{14}C -Leucine dans les protéines ribosomales.

Ces expériences nous ont permis de souligner l'importance respective des cofacteurs et des fraction sub-cellulaires habituellement utilisés. Ces résultats font ressortir l'importance de la fraction soluble (surnageant à 105.000 g) qui contient, les enzymes d'activation et les ARN de transfert, ainsi que celle de l'ATP, donneur d'énergie, et du GTP, impliqué dans le transfert des amino-acyl-ARNt sur les ribosomes (une μ mole de GTP est consommée par μ mole d'acide aminé transféré).

T A B L E A U V I I I

INCORPORATION DE ^{14}C -LEUCINE DANS LES PROTEINES RIBOSOMALES DE FOIE.

Nombre de cas	CONDITIONS D'INCUBATION	Incorporation en cp/mn/mg de Protéines
10	Système complet	1495 $\pm$ 83
2	Système complet sans ribosomes	23
3	Système complet sans surnageant	480 $\pm$ 41
4	Système complet sans surnageant, sans GTP	129 $\pm$ 19
4	Système complet sans GTP	398 $\pm$ 25
5	Système complet sans PEP, sans Pyruvate Kinase	421 $\pm$ 32
4	Système complet sans ATP	345 $\pm$ 29
5	Système complet sans Acides Aminés ^{12}C	1030 $\pm$ 67

Les valeurs moyennes, compte-tenu des corrections de self-absorption, sont suivies de l'erreur-type.

Système complet : Suspension de ribosome, enzyme pH 5, surnageant 105.000 g, d-1 ^{14}C leucine, mélange de l- ^{12}C acides aminés, ATP, GTP, PEP, PK, MgCl_2 , KCl, Tris pH 7,6, saccharose, cystéamine.

Il faut retenir également la nécessité d'adjoindre au milieu d'incubation un système régénérateur d'énergie (PEP + KP), ainsi qu'un mélange d'acides aminés non marqués. Ceci s'explique par le fait qu'il existe toujours de l'ARN messager endogène fixé sur les ribosomes, au moment de l'incubation, et que le seul acide aminé marqué ne peut permettre, en l'absence d'un fonds commun d'acides aminés, la synthèse d'une chaîne peptidique ou son achèvement en cours de synthèse.

Nous avons également déterminé le rapport ARN/Protéines de plusieurs préparations de ribosomes. Ce rapport variait de 0,6 à 0,9 sans que l'on puisse relever de différence notable dans leur capacité d'incorporer les acides aminés.

d) Incorporation de ^{14}C -Proline dans le collagène de l'aorte et du foie

Le métabolisme du collagène, étudié grâce à l'incorporation de Proline marquée, a été le plus souvent envisagé dans des tissus ayant une grande activité métabolique : tissus en voie de croissance (embryon de poulet) ou en cours de régénération (granulome expérimental).

Etant donné que le collagène est le siège de remaniements histologiques importants, au cours du processus athérogène, nous avons été amené à étudier comparativement, dans un premier temps, l'activité métabolique de l'aorte et du foie chez le lapin adulte normal.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau IX.

T A B L E A U IX

INCORPORATION DE ^{14}C -PROLINE DANS LE COLLAGÈNE INSOLUBLE CHEZ
LE LAPIN NORMAL

ORGANES	CAS	$\mu\text{moles/g}$	Cps/mn/mg	ACTIVITE SPECIFIQUE
AORTE	10	32,4 $\pm$ 2,2	4.236 $\pm$ 878	161 $\pm$ 56
FOIE	10	1,3 $\pm$ 0,2	2.067 $\pm$ 265	2136 $\pm$ 695

Les valeurs moyennes sont suivies de l'erreur-type.

Comme le fait ressortir l'étude du tableau IX, la quantité de Proline incorporée dans le collagène insoluble est plus importante dans le tissu hépatique que dans le tissu aortique. Ceci est confirmé par l'analyse statistique effectuée par le test t ($P < 0,05$). Ces résultats soulèvent le problème d'une activité métabolique du collagène différente dans ces deux tissus. Le taux d'incorporation des acides aminés marqués dans le collagène est indépendant de sa concentration tissulaire, en particulier en ce qui concerne le tissu hépatique qui présente une activité élevée pour une faible concentration en collagène. Des expériences complémentaires nous ont permis de comparer les activités spécifiques de la proline et de l'hydroxyproline.

Le rapport Pro/Hypro dans ces deux organes s'écarte de l'unité, ce qui n'est pas en faveur d'une filiation directe.

3 - ETUDE DES FRACTIONS PROTEIQUES SOLUBLES DE L'AORTE HUMAINE

Il nous a été possible, au cours de notre travail, de disposer d'aortes humaines, prélevées post-mortem, ce qui nous a incité à étudier la perméabilité de l'intima aortique, vis-à-vis des protéines du sérum.

En effet, les techniques électrophorétiques ont permis de mettre en évidence dans la paroi aortique un certain nombre de fractions protéiques, dont les mobilités sont comparables à celles de l'albumine et des globulines sériques. La confirmation de l'origine sérique de ces protéines a d'ailleurs été fournie par l'emploi de sérum-albumine marquée par ^{131}I (82, 83).

Cependant, l'identification exacte de ces protéines aortiques extractibles par des solutions salines ou glucosées n'a fait l'objet jusqu'alors que d'études fragmentaires. Seule a été établie avec certitude la présence d'albumine (84) et de β -lipoprotéines (85).

Ce travail a consisté à préciser par immunoélectrophorèse la nature des fractions protéiques présentes. L'électrophorèse sur papier permet de discuter des variations entre les fragments vasculaires normaux et athéroscléreux.

Nous avons écarté la technique d'extraction préalable du milieu par l'éther refroidi car ce procédé entraîne un abaissement notable du taux des protéines, de l'ordre de 12 %, ainsi que la disparition à l'immunoélectrophorèse de certains arcs de précipitation, en particulier en ce qui concerne les fractions lipoprotéiques. La figure 3 montre les différences observées avant et après traitement par l'éther.

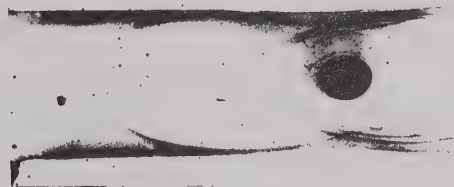
FIGURE 3

Comparaison des arcs de précipitation obtenus avec les extraits aortiques
traités et non traités par l'éther.

Traité par éther



Non traité par éther



a) Identification des fractions par immunoélectrophorèse

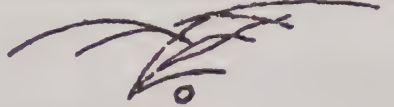
Sur l'ensemble des extraits obtenus à partir des 25 échantillons d'aorte, l'immun-sérum anti-sérum total nous a toujours donné les mêmes résultats. Les figures 4 et 5 reproduisent les arcs de précipitation obtenus, d'une part pour un extrait aortique normal et d'autre part pour un extrait athéroscléreux. Nous donnons également, à titre de comparaison, sur la figure 5, le diagramme obtenu avec un sérum humain normal.

On peut noter dans les deux cas la présence de sept fractions distinctes. Ces fractions ont des mobilités qui semblent correspondre à celles des albumines, α_1 , α_2 , β et γ -globulines. Ces fractions sont identiques, aussi bien dans le cas des aortes normales que dans le cas des aortes présentant des lésions athéromateuses, et ceci pour les 25 cas étudiés.

En ce qui concerne les anti-sérums anti-lipoprotéines nous avons observé que les sérums anti α_1 et anti β donnent des arcs de précipitation caractéristiques avec les extraits non soumis à l'éther. En revanche, l'anti-sérum anti α_2 -lipoprotéine ne nous a jamais donné de réaction positive.

Pour les deux anti-sérums, anti γ_{1M} et anti γ_{1A} -globulines, seul l'anti-sérum anti γ_{1M} donne un arc de précipitation. Cet arc se trouve déplacé par rapport à sa position normale, mais on sait que l'arc de précipitation de cette globuline n'est pas d'une fixité remarquable. Les figures 4 et 5 représentent les résultats positifs obtenus avec l'immun-sérum anti α_1 -lipoprotéine et le mélange des anti α_1 , β lipo- et γ_{1M} -globulines.

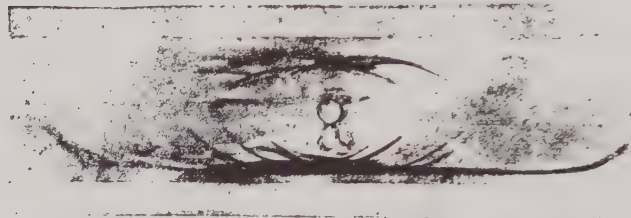
FIGURE 4

	Fragment normal Immunsérum total
	Fragment athéroscléreux Immunsérum total
	Immunsérum anti α_1 lipoprotéine
	Immunsérum anti α_2 lipoprotéine
	Immunsérum anti β lipoprotéine
	Immunsérum anti σ_1 A
	Immunsérum anti σ_1 M

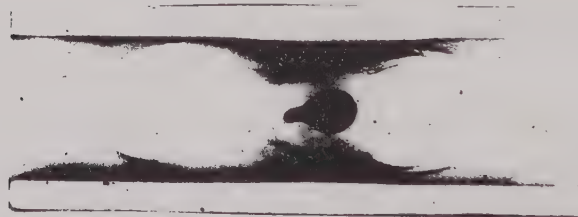
Immuno-électrophorèse des protéines solubles de l'aorte humaine
(Immunsérums anti-protéines sériques humaines)

FIGURE 5

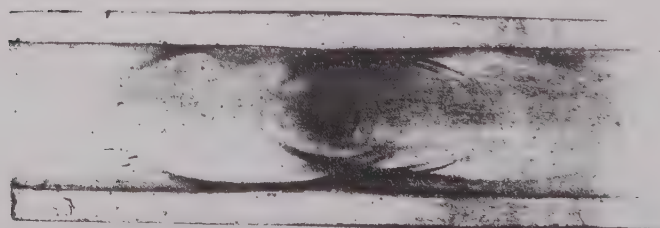
Immuno-électrophorèse d'un sérum sanguin normal



Immuno-électrophorèse d'un extrait aortique normal



Immuno-électrophorèse d'un extrait aortique athéroscléreux



b) Comparaison par électrophorèse sur papier des fractions des aortes normales et athéroscléreuses

Les valeurs des pourcentages des protéines et des lipoprotéines sont indiquées sur le tableau X.

Le protéinogramme des fragments athéroscléreux présente des différences significatives vis-à-vis de celui des fragments normaux : l'albumine est diminuée ($P < 0,0005$) ainsi que les globulines α ($0,00125 > P > 0,010$) et les globulines γ ($P < 0,0005$), tandis que les globulines β sont nettement augmentées ($P < 0,005$). Le lipidogramme montre des variations des fractions α et β . Ces variations sont représentées par une diminution des α -lipoprotéines et une augmentation des β -lipoprotéines dans les fragments athéroscléreux.

L'étude comparative, par immuno-électrophorèse, des protéines solubles d'aortes normales et athéroscléreuses, permet d'identifier des fractions ayant les caractères antigéniques des protéines sériques.

La caractérisation de ces fractions montre qu'elles sont identiques dans les deux types de tissus considérés.

Sur les sept arcs de précipitation mis en évidence grâce à l'immunoélectrophorèse, cinq peuvent être identifiés avec certitude :

L'albumine grâce d'une part, à sa position caractéristique sur l'immunoélectrophorégramme et d'autre part, à sa réaction positive en présence d'acide 2 (4' Hydroxy-azobenzène) benzoïque. Ce fait est en accord avec les conclusions précédemment acquises par électrophorèse et par utilisation d'albumine marquée (82, 83).

T A B L E A U X

POURCENTAGE DES FRACTIONS PROTÉIQUES DES EXTRAITS AORTIQUES NORMAUX ET ATHEROSCLÉREUX

Examen		Tissu aortique normal (10 cas)		Tissu aortique athéroscléreux (15 cas)	
		Pourcentages	Erreur type	Pourcentages	Erreur type
Protéinogramme	Alb	35,8	$\pm 0,52$	32,1	$\pm 0,45$
	α	9,2	$\pm 0,24$	8,5	$\pm 0,17$
	β	24,0	$\pm 1,10$	32,2	$\pm 0,66$
	γ	31,0	$\pm 0,65$	27,2	$\pm 0,95$
	α	19,1	$\pm 0,46$	13,4	$\pm 0,36$
Lipidogramme	β	80,9	$\pm 0,46$	86,6	$\pm 0,36$

Une α_1 -lipoprotéine grâce à son anti-sérum spécifique.

Une β -lipoprotéine grâce à son anti-sérum spécifique. Le test de Burstein au sulfate de dextrane est également positif pour tous les extraits aortiques étudiés.

Une γ_{1M} -globuline grâce à son anti-sérum spécifique.

Une γ -globuline dont l'arc de précipitation absolument caractéristique est indiscutable.

L'existence d'une α_2 -lipoprotéine avait été mise en évidence par LOHMANN (84). Nous ne retrouvons pas l'arc de précipitation de cette globuline en présence de son anti-sérum spécifique. Nous supposons que l'antigène spécifique est en quantité trop faible pour permettre l'identification de cette lipoprotéine.

Les deux derniers arcs de précipitation présents sur l'immunoélectrophorègramme avec l'anti-sérum total n'ont pu être identifiés avec certitude faute d'un anti-sérum spécifique que nous n'avons pu préparer par suite des taux extrêmement faibles de ces composés dans le milieu étudié et des difficultés d'isolement. Nous pouvons dire cependant que ces deux fractions sont localisées dans la zone des α et β -globulines.

Ces données confirment pleinement l'existence d'une filtration des protéines sériques à travers la paroi aortique et leur fixation au niveau de ce tissu.

Les variations entre les deux types de fragments n'intéressent que les quantités des différentes protéines comme on peut l'observer par électrophorèse sur papier. Ces variations se manifestent surtout par une augmentation des β -globulines et plus spécialement des β -lipoprotéines dans les fragments athéroscléreux.

Ces résultats attirent l'attention sur la place des β -lipoprotéines sériques dans la plaque d'athérosclérose, mais ils ne permettent pas de préciser si elles jouent un rôle dans la génèse de la lésion ou si elles proviennent d'une augmentation de la perméabilité de l'intima aortique vis-à-vis des β -lipoprotéines.

CHAPITRE III

ETUDE DU METABOLISME ENERGETIQUE

1 - REPARTITION DES NUCLEOTIDES ET DES DERIVES PHOSPHORYLES DU TISSU AORTIQUE ET DU TISSU HEPATIQUE

Tissu Aortique

a) Fractions phosphorylées

Les résultats sont présentés dans le tableau XI.

Quelle que soit la race étudiée les teneurs en phosphate acidosoluble total, en phosphate minéral vrai et en phosphate résiduel de l'aorte (intima + média) sont pratiquement identiques. La concentration en esters phosphorylés très labiles est faible dans tous les cas ; elle est cependant environ deux fois plus importante chez les albinos et les consanguins que chez les lapins de race commune.

On constate une très faible dispersion des résultats chez les animaux consanguins.

b) Nucléotides libres

Les résultats sont présentés dans le tableau XII.

Les teneurs en ATP sont nettement plus élevées que celles déterminées par d'autres auteurs, avec d'autres animaux (environ 10 fois plus). Les valeurs indiquées ici ont été contrôlées par la méthode de dosage enzymatique basée sur la luminescence d'extraits de *Photinus Pyralis*.

T A B L E A U X I

REPARTITION DES FRACTIONS PHOSPHORYLEES ACIDO-SOLUBLES DE L'AORTE
CHEZ LE LAPIN NORMAL

RACE	P TOTAL	P MINERAL	P LABILE	P RESIDUEL
COMMUNE	293 ± 12,6	114 ± 8,6	5 ± 1,8	76 ± 7,5
ALBINS	290 ± 8,6	101 ± 9,2	11 ± 1,8	83 ± 12,9
CONSANGUINS	303 ± 6,5	116 ± 3,4	12 ± 0,8	74 ± 4,5

Les valeurs moyennes (10 cas) exprimées en µg de Phosphore par gramme de poids frais, sont suivies de l'erreur-type.

T A B L E A U X I I

REPARTITION DES NUCLEOTIDES ADENYLIQUES ACIDO-SOLUBLES DE L'AOORTE
CHEZ LE LAPIN NORMAL

RACE	ATP	ADP	AMP	NAD ⁺
COMMUNE	14,7 ± 1,8	24,6 ± 1,6	traces	10,9 ± 1,2
ALBINS	14,3 ± 0,9	26,6 ± 1,9	traces	12,0 ± 1,4
CONSANGUINS	19,2 ± 1,0	31,1 ± 1,6	traces	14,0 ± 0,4

Les valeurs moyennes (10 cas), exprimées en μ moles par 100 grammes de poids frais, sont suivies de l'erreur-type.

Les teneurs en ADP sont très élevées par rapport à celles d'ATP ; le rapport ATP/ADP est toujours voisin de 0,6 chez les animaux témoins, quelle que soit la race.

Dans tous les cas il n'y a pas ou presque pas d'AMP libre (traces à peine visibles sur les chromatogrammes et non dosables). Aucune trace de 3', 5'-AMP cyclique ($R_f = 1,12$) n'a jamais pu être observée.

Les teneurs en NAD sont importantes.

Chez les lapins consanguins la teneur en nucléotides est plus élevée et les valeurs individuelles plus homogènes .

D'autres nucléotides apparaissent sur les chromatogrammes et migrent à des R_f plus courts que celui de l'ATP. Leur identification a été réalisée, à titre uniquement qualitatif, par chromatographie bidimensionnelle, en présence de témoins, et grâce à leurs spectres d'absorption U.V. Ces nucléotides non adényliques, correspondent à l'IMP, l'UTP, l'UDP, le GTP, le GDP, et le CTP. De plus nous avons pu identifier, à l'état de traces, le NADP. Il faut noter que l'ensemble de ces nucléotides n'ont jamais été retrouvé systématiquement d'un chromatogramme à l'autre.

Tissu Hépatique

a) Fractions phosphorylées

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XIII.

On note des taux importants de phosphore total, minéral et résiduel, qui sont respectivement, cinq, quatre et huit fois plus élevés environ que dans le tissu aortique. En revanche, le taux moyen de phosphore labile est du même ordre de grandeur.

b) Nucléotides libres

Les résultats sont représentés dans le tableau XIV.

Nous constatons que le tissu hépatique est très riche en nucléotides adényliques (environ 80 % du phosphore total des nucléotides libres). Dans tous les cas, on relève un taux appréciable d'AMP, ainsi qu'une teneur importante en NAD.

Par ordre d'importance décroissante nous relevons l'AMP, l'ADP, l'ATP et le NAD. Le rapport ATP/ADP est égal à 0,98.

Outre les nucléotides adényliques, nous avons mis en évidence, grâce au protocole précédemment rapporté, la présence d'IMP, de CTP, de GMP, de GDP, de GTP, et d'UTP.

2 - METABOLISME OXYDATIF DE LA PAROI AORTIQUE

De très nombreux travaux ont été consacrés à l'artériosclérose humaine et expérimentale mais paradoxalement le comportement métabolique de la paroi artérielle normale n'a que peu retenu l'attention.

La respiration de l'aorte cependant a été envisagée par quelques auteurs chez différentes espèces animales (1, 59, 86 à 89). Chez le lapin, la capacité oxydative du tissu aortique a été étudié par MAIER et HAIMOVICI (88, 89) CHATTOPADHYAY (90), COSTA et coll. (91), MICHELAZZI (92) et HENDERSON et Mac DOUGALL (93). Tous ces auteurs rapportent la consommation d'oxygène étudiée par la technique classique de WARBURG, soit au poids sec soit au contenu en azote de la paroi artérielle. Cette façon d'exprimer les mesures de respiration soulève une critique importante qui tient au fait que l'ensemble du tissu conjonctif (collagène, et élastine notamment) ainsi que le matériel inter-

T A B L E A U X I I I

REPARTITION DES FRACTIONS PHOSPHORYLEES ACIDO-SOLUBLES DU FOIE
CHEZ LE LAPIN NORMAL

FRACTIONS	P TOTAL	P MINERAL	P LABILE	P RESIDUEL
$\bar{X} \pm sm$	1421 $\pm$ 61	485 $\pm$ 35	6,2 $\pm$ 1,3	583 $\pm$ 35

Les valeurs moyennes (12 cas) sont exprimées en μg de Phosphore
par gramme de poids frais.

T A B L E A U X I V

REPARTITION DES NUCLEOTIDES ADENYLIQUES ACIDO-SOLUBLES DU FOIE
CHEZ LE LAPIN NORMAL

NUCLEOTIDES	ATP	ADP	AMP	NAD ⁺
$\bar{X} \pm sm$	153,5 $\pm$ 9,3	157,0 $\pm$ 6,6	178,0 $\pm$ 14,0	94,0 $\pm$ 6,1

Les valeurs moyennes (13 cas) sont exprimées en $\mu moles$ pour
100 grammes de poids frais.

cellulaire (fibres élastiques en particulier) qui compose la trame de l'artère, ne respire pas. Aussi commet-on une très grosse erreur par défaut, si l'on se réfère au poids sec ou à la concentration en protéines.

C'est pourquoi, comme l'on préconisé certains auteurs, LEHNINGER (94) notamment, nous avons rapporté les XO_2 obtenus pour l'oxydation des substrats étudiés à la quantité d'ADN contenue dans l'artère. L'ADN en effet, en tant que constituant typique des noyaux cellulaires, donne une mesure de la quantité de cellules présentes dans le fragment d'aorte examiné. De cette façon, il devient possible de mesurer la respiration absolue des cellules du tissu étudié.

a) Teneurs en ADN et en ARN de l'aorte et du foie

A titre comparatif, nous avons déterminé la teneur en ADN et en ARN du tissu aortique et hépatique.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XV.

Il convient de noter, que les taux d'ADN dans les deux tissus, déterminés par deux méthodes différentes, sont pratiquement superposables. En ce qui concerne le tissu hépatique, les valeurs obtenues sont comparables pour l'ADN comme pour l'ARN, à celles qui sont citées dans la littérature, chez d'autres animaux (44). On constate que le tissu aortique contient, rapporté au poids sec, environ 20 fois moins d'ADN et 40 fois moins d'ARN que le tissu hépatique. Ces données sont parfaitement compatibles avec ce que l'on connaît de la structure histologique de l'aorte où se remarque la pauvreté en cellules, localisées presque exclusivement dans l'intima. Ces faits s'accordent également avec la faible teneur en nucléotides de l'aorte comparée à celle du foie (Cf Tableaux XII et XIV).

T A B L E A U X V

TENEURS CUMPAREES EN ADN ET EN ARN DU TISSU AORTIQUE ET HEPATIQUE CHEZ LE LAPIN

TISSUS	Poids sec de Poids frais	ADN		ARN	Rapport $\frac{\text{ARN}}{\text{ADN}}$	VALEURS EXTREMES	
		INDCL	LIPHENYL- AMINE	URCINOL		ADN	ARN
AORTE	24,5	0,07 + 0,01	0,08 + 0,02	0,11 + 0,03	1,38	0,058 - 0,105	0,075 - 0,152
FOIE	24,0	1,59 + 0,19	1,63 + 0,24	4,48 + 0,36	2,79	1,35 - 1,93	4,10 - 4,86

Les valeurs moyennes, exprimées en pourcentage de poids sec, sont suivies de l'erreur-type (10 cas).

b) Capacité oxydative de coupes d'aortes vis-à-vis de différents substrats

Les résultats concernant l'étude de la consommation d'oxygène de fragments aortiques, en présence de différents substrats, sont rassemblés dans le tableau XVI.

Nous avons conduit parallèlement trois séries d'expériences. Nous avons étudié en effet la consommation d'oxygène, d'une part en présence du seul tampon phosphate pour pouvoir déterminer le taux de la respiration endogène, d'autre part avec un milieu enrichi systématiquement en glucose, pyruvate, fumarate et glutamate (système complet), enfin en présence de tampon phosphate avec adjonction d'un substrat déterminé (concentration $1 \times 10^{-2}M$ ou $1 \times 10^{-3}M$). L'expression des résultats se réfère comparativement aux QO_2 (mg de poids sec/heure) et aux XO_2 (mg ADN/heure).

L'examen du tableau XVI montre que le taux de la respiration endogène ($QO_2 = 0,72$) est faible dans le tissu aortique, comparée au tissu hépatique ($QO_2 = 5,58 \pm 0,23$). Les valeurs moyennes de QO_2 trouvées dans la littérature, comprises entre 0,56 et 0,90, pour l'aorte de lapin, sont du même ordre de grandeur que celle que nous avons déterminée. L'utilisation d'un milieu complété (système complet) ne modifie pas de façon notable, la consommation d'oxygène par rapport au milieu ne contenant que du tampon phosphate (QO_2 respectifs 0,78 et 0,72).

De plus les résultats rapportés dans le tableau XVI indiquent que l'addition de glucose ne stimule pas le taux de respiration endogène des coupes de tissu aortique. Ceci est vraisemblablement dû au fait que le glucose est présent en quantité suffisante dans le tissu artériel, comme en témoigne l'importante activité glycolytique de ce tissu (1). Ceci est valable pour la plupart des substrats étudiés.

T A B L E A U XVI

TAUX D'OXYDATION DE DIFFERENTS SUBSTRATS PAR DES COUPES DE TISSU AORTIQUE

SUBSTRATS	Nombre de cas	QO_2 $mm^3 O_2/mg$ poids sec par heure	XO_2 $\mu l O_2/mg$ ADN par heure	P
TAMPON PHOSPHATE	18	$0,72 \pm 0,04$	$86,4 \pm 6,5$	$P > 0,05$
SYSTEME COMPLET	101	$0,78 \pm 0,04$	$93,6 \pm 7,8$	-
GLUCOSE	10	$0,74 \pm 0,03$	$88,8 \pm 5,5$	$P > 0,05$
CITRATE	5	$0,69 \pm 0,05$	$82,8 \pm 8,2$	$P > 0,05$
ISO-CITRATE	5	$0,71 \pm 0,03$	$85,2 \pm 6,9$	$P > 0,05$
α CETO-GLUTARATE	4	$0,79 \pm 0,04$	$94,8 \pm 8,5$	$P > 0,05$
SUCCINATE	18	$1,31 \pm 0,06$	$157,2 \pm 12,5$	$P < 0,01$
FUMARATE	6	$0,71 \pm 0,05$	$85,2 \pm 6,5$	$P > 0,05$
MALATE	6	$0,73 \pm 0,06$	$87,6 \pm 8,2$	$P > 0,05$
PYRUVATE	6	$0,70 \pm 0,05$	$84,0 \pm 5,8$	$P > 0,05$
LACTATE	6	$0,78 \pm 0,04$	$93,6 \pm 8,0$	$P > 0,05$
ACETOACETATE	8	$0,76 \pm 0,03$	$91,2 \pm 7,8$	$P > 0,05$

Les valeurs moyennes sont suivies de l'erreur-type.

Les valeurs de P sont calculées par rapport au système complet.

En revanche les valeurs moyennes de QO_2 et de XO_2/ADN , sont plus élevées, en présence d' α Cétoglutarate, d'acétoacétate et de lactate ; toutefois les différences ne sont pas statistiquement significatives. Ces résultats sont en accord avec ceux de CHATTOPADHYAY (90).

Deux faits intéressants sont à noter. En premier lieu, le tissu aortique est capable d'oxyder l'acétoacétate au même taux que le glucose (QO_2 respectifs 0,76 et 0,74). D'autre part, l'aorte oxyde le succinate à un taux supérieur à celui de tous les autres substrats ($QO_2 = 1,31$). Le QO_2 et le XO_2/ADN en présence de succinate est en effet significativement supérieur par rapport au RINGER phosphate sans substrats ($QO_2 = 0,72$) ou au système complet. Le taux d'oxydation du succinate est près du double de celui du glucose. Cette stimulation de la respiration lié à l'oxydation du succinate dans le tissu aortique a été rapportée par KIRK et coll. (95) chez l'homme, par BRIGGS et coll. (96) chez le rat, par DI SABATO et COMOLLI (87) chez le porc, le rat, la souris et le lapin.

Certains auteurs (89, 90) trouvent un taux d'oxydation du succinate 3 à 4 fois supérieur à celui du glucose. Nous avons pu comparer nos résultats, exprimés en XO_2/ADN , avec ceux de DI SABATO et COMOLLI (87). Les valeurs obtenues pour l' α cétoglutarate et l'acétoacétate sont concordantes. En revanche l'oxydation du succinate nous a donné une valeur légèrement supérieure (157,2 $\mu l O_2/mg$ ADN au lieu de 139,9). Les travaux de CHATTOPADHYAY (90), de MAIER et HAIMOVICI (89) font ressortir une différence dans le taux d'oxydation du succinate en fonction de la topographie aortique. Les valeurs sont plus élevées pour la crosse et l'aorte thoracique que pour l'aorte abdominale. Ces faits sont corroborés par l'étude de l'activité succino-déshydrogénasique de ces différents segments aortiques qui montre que l'activité de la déshydro-

génase est plus importante au niveau de l'aorte ascendante (crosse et partie thoracique supérieure).

Au cours de cette expérimentation nous avons étudié également l'influence de l'adrénaline sur la respiration du tissu aortique. Les animaux sont soumis à une injection intra-veineuse d'adrénaline ($46 \mu\text{g/kg}$ de poids) puis sacrifiés à des intervalles de temps compris entre 10 et 60 minutes. Les mesures de QO_2 , effectuées après action de l'adrénaline, nous ont permis de constater une diminution de la respiration dans les aortes traitées. La valeurs moyenne de QO_2 significativement abaissée de plus de 25 % ($P < 0,01$) chez les animaux sacrifiés 20 minutes après action de l'adrénaline ($\text{QO}_2 = 0,58 \pm 0,04$).

Cette inhibition du métabolisme aérobie, sous l'influence de l'adrénaline, dans le tissu aortique, est un fait expérimental en accord avec les résultats obtenus par GAUTHERON et CLAUSER (97, 98) dans le muscle utérin et le diaphragme chez le rat.

c) Oxydation du pyruvate et du succinate par des homogénats d'aorte et de foie : Rapports P/O.

Les résultats concernant le taux d'oxydation des différents substrats du cycle de KREBS, dans le tissu aortique, (tableau XVI) nous ont incité à étudier la capacité de phosphorylation oxydative d'homogénats tissulaires, en présence d'une part du couple pyruvate-malate, d'autre part du succinate seul. Là encore nous avons choisi le tissu hépatique comme système de référence. Il nous a paru intéressant d'envisager cet aspect du métabolisme énergétique qui n'a été étudié que par WOLLEMAN et KOCSAR (59) à partir d'homogénats chez le rat, uniquement en présence de pyruvate et de malate.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XVII.

T A B L E A U X V I I

PHOSPHORYLATIONS OXYDATIVES A PARTIR D'HOMOGENATS D'AORTE ET DE FOIE CHEZ LE LAPIN NORMAL.

ORGANES	Nombre de cas	SUBSTRATS (1 x 10 ⁻² M)	RAPPORTS P/O
AORTE	16	Pyruvate Malate	1,8 ± 0,2
	10	Succinate	1,4 ± 0,2
FOIE	16	Pyruvate Malate	2,1 ± 0,2
	10	Succinate	1,5 ± 0,3

Les valeurs moyennes sont suivies de l'erreur-type.

Deux ordres de faits se dégagent des résultats présentés dans le tableau XVII. Ces résultats indiquent en effet que la phosphorylation oxydative est une des caractéristiques du métabolisme oxydatif du tissu aortique, capable comme n'importe quel autre tissu, d'oxyder les substrats du cycle de KREBS ; cette oxydation par couplage avec le fonctionnement des chaînes respi-

ratoires et la consommation de phosphate conduit à la synthèse d'ATP en aérobiose comme en témoignent les rapports P/O obtenus avec le pyruvate et le succinate.

D'autre part, compte-tenu du fait que l'évaluation des rapports P/O maxima ne saurait être possible qu'avec des suspensions mitochondriales isolées, on constate que l'activité des homogénats d'aorte est très importante, comparée à celle d'homogénats de foie. Les rapports P/O, en présence de pyruvate ou de succinate, ne diffèrent pas de façon significative.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE L'ADRENALINE SUR LES COMPOSES PHOSPHORYLES DU TISSU AORTIQUE

A) EVOLUTION DES NUCLEOTIDES ADENYLIQUES ET DES FRACTIONS PHOSPHORYLEES DE L'AORTE SOUS L'INFLUENCE DE L'ADRENALINE.

Etant donné l'effet de l'adrénaline sur la respiration du tissu aortique, il nous a paru intéressant d'étudier l'évolution des différentes fractions phosphorylées dans ce tissu sous l'influence de l'adrénaline.

L'intensité du métabolisme énergétique d'un tissu étant réglé par ses besoins en dérivés riches en énergie et par le taux des accepteurs de phosphate, nous avons recherché si la diminution de la respiration de l'aorte s'accompagnait d'une variation parallèle du taux des nucléotides adényliques.

Nous avons effectué trois séries d'expériences. Au cours de la première expérience, nous avons dosé les différents nucléotides adényliques et les fractions phosphorylées en fonction du temps écoulé après l'injection intra-veineuse de l-adrénaline. Parallèlement nous avons soumis les animaux à des injections quotidiennes, à des doses progressivement croissantes, pendant un mois pour vérifier si ce traitement modifiait le taux des fractions phosphorylées. Enfin nous avons étudié la cinétique d'évolution des fractions phosphorylées après injection unique de faibles doses d'adrénaline.

1) Effets d'une injection unique d'adrénaline de 46 $\mu\text{g/kg}$

Les résultats sont présentés dans le tableau XVIII et la figure 6.

Phosphore total : L'adrénaline provoque une baisse du phosphore total, très significative entre la dixième et la vingtième minute qui suit l'injection (10 mn : $0,001 < P < 0,01$; 20 mn : $P < 0,001$). Le taux normal ne se rétablit qu'au bout de deux heures.

Phosphore minéral : L'adrénaline provoque une augmentation rapide et significative de cette fraction, dès les premières minutes.

Entre 10 et 20 mn : $0,02 < P < 0,05$.

Phosphore labile : Cette fraction baisse légèrement sous l'influence de l'adrénaline.

Phosphate résiduel : Son taux est peu affecté.

ATP : Dès les premières minutes l'adrénaline provoque une baisse significative du taux d'ATP ; après 5, 10, 20 ou 30 mn : $0,001 < P < 0,01$.

L'effet maximum est obtenu vers la vingtième minute (63 p. 100 de diminution).

ADP : On observe un phénomène du même type ; le taux d'ADP baisse cependant moins.

Après 10, 20 et 30 mn : $0,001 < P < 0,01$.

TABLEAU XVIII

Variations des fractions phosphorylées de l'aorte de Lapins normaux sous l'influence d'une injection intraveineuse d'adrénaline (46 µg/Kg), dans le temps qui suit l'injection.

Nombre de cas	Temps en minutes	P total	P minéral	P labile	P résiduel	ATP	ADP	NAD	AMP
5	0 (animaux non injectés)	294 ₋ 19,2	74 ₋ +10,7	16,1 ₋ +1,7	68,5 ₋ +6,2	17 ₋ +2	16 ₋ +0,7	7,1 ₋ +0,4	0
5	5	240 ₋ +9,2	101 ₋ +6,1	12,6 ₋ +3,1	86 ₋ +11,5	9,7 ₋ +2,2	12,3 ₋ +2,1	6,7 ₋ +1,2	0
6	10	223 ₋ +5,4	104 ₋ +7,3	11,9 ₋ +3,4	78,1 ₋ +10	7,2 ₋ +2	8,1 ₋ +1,7	4,8 ₋ +1,3	0
6	20	214 ₋ +16	110,2 ₋ +10	12,6 ₋ +2	73 ₋ +4,1	6,4 ₋ +1,6	7,3 ₋ +1,6	4,2 ₋ +1,2	0
4	30	244 ₋ +14	117 ₋ +9	13,4 ₋ +1,1	74 ₋ +6	8,6 ₋ +0,9	10,3 ₋ +1,3	5,1 ₋ +0,4	0
5	60	248 ₋ +18,8	98,1 ₋ +11,2	15,1 ₋ +0,5	68,8 ₋ +3,5	11,5 ₋ +1,6	13,6 ₋ +1,9	5,9 ₋ +0,4	0
4	90	274 ₋ +1,3	73 ₋ +6	15,2 ₋ +2,3	67,9 ₋ +4,2	16,4 ₋ +2	15,7 ₋ +1,2	7,2 ₋ +1,2	0
3	120	284 ₋ +10,9	77 ₋ +18,4	16,4 ₋ +0,5	70 ₋ +6,1	16,9 ₋ +1,1	16,2 ₋ +0,9	7,3 ₋ +1,2	0

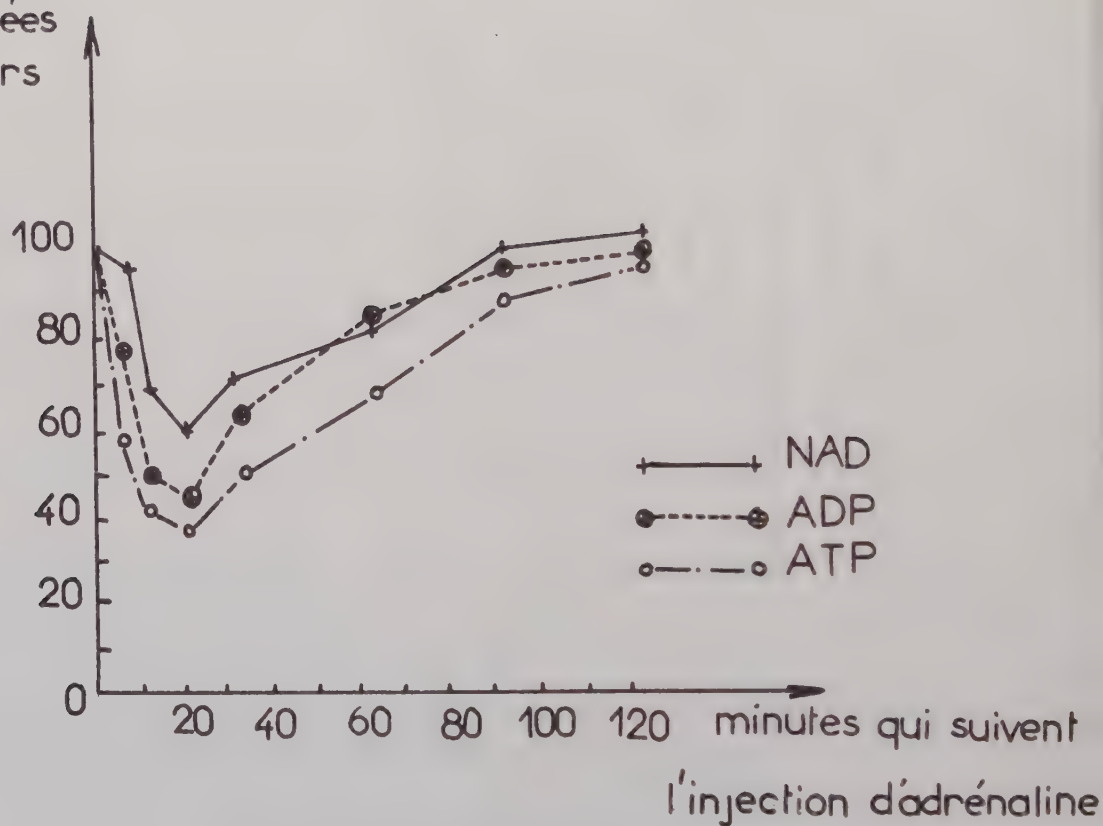
Les résultats sont exprimés en µg de phosphore par g de tissu frais.

Signification des résultats : voir dans le texte les résultats du test t. (page 100 à 103).

FIGURE 6

Influence de l'adrénaline sur l'évolution des nucléotides
de l'aorte de lapins normaux .

teneurs exprimées
en % des valeurs
normales



AMP : On n'observe jamais d'apparition d'AMP libre ou de 3', 5' AMP cyclique.

NAD : On observe une baisse significative sous l'effet de l'adrénaline ; après 30 mn : $0,001 < P < 0,01$. Là aussi l'effet maximum est obtenu vingt minutes après l'injection. La figure 6 reproduit la cinétique d'évolution de ces nucléotides. Les taux normaux sont restaurés environ une heure et demie après l'injection.

2) Effets d'injections répétées d'adrénaline pendant un mois

On voit dans le tableau XIX que ce traitement abaisse fortement les taux de phosphore total, phosphate minéral, de phosphate labile, d'ATP et d'ADP. En revanche le taux de phosphore résiduel et celui de NAD ne sont pas sensiblement affectés.

3) Effets produits par une seule injection d'adrénaline à faible dose (46 $\mu\text{g/kg}$ de poids).

Le tableau XX montre les résultats. Les fractions suivantes sont affectées :

Phosphate minéral : Dès l'injection, il augmente notablement. Après 45 minutes la valeur normale n'est pas rétablie.

Phosphate labile : Après 15 minutes le taux baisse notablement.

ATP et ADP : A 45 minutes le taux est légèrement abaissé.

T A B L E A U X I X

INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'UN MOIS A L'ADRENALINE (INJECTIONS REPETÉES A DOSES PROGRESSIVES) SUR
LES FRACTIONS PHOSPHORYLÉES DE L'ACIDE DE LAPINS NORMAUX

	P TOTAL	P MINERAL	P LABILE	P RESIDUEL	ATP	ADP	NAD
TEMOINS (10 animaux)	303 ± 6,5	116 ± 3,4	12 ± 0,8	74 ± 4,5	17,3 ± 0,9	18,7 ± 0,9	8,4 ± 0,2
INJECTES (10 animaux)	205 ± 33	67,5 ± 3,8	3 ± 0,98	53 ± 5,5	4,3 ± 1,2	8,5 ± 2,7	5,5 ± 1,6
Test t	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$0,1 < P < 0,2$	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P = 0,4$

Les résultats sont exprimés en µg de phosphore par g de tissu frais.

TABLEAU XX

Variations des fractions phosphorylées de l'acide de lapins normaux dans le temps qui suit l'injection d'une dose faible d'adrénaline (4,6 µg/Kg).

Temps d'action	Nombre de cas	P total	P minéral	P labile	P résiduel	ATP	ADP	NAD	AMP
Témoins	5	294 + 19,2 _	74 + 10,7 _	16,1 + 1,7 _	68,5 + 6,2 _	17 + 2 _	16 + 0,7 _	7,1 + 0,4 _	0
Injection puis sacrifice immédiat	3	317 + 26,0 _	117 + 6,3 _	18,1 + 5,2 _	74,0 + 3,4 _	17,7 + 2,0 _	18,8 + 0,9 _	8,4 + 1,0 _	0
15 minutes	2	295 + 5,0 _	98 + 6,0 _	8,1 + 6,5 _	87,3 + 6,3 _	17,3 + 0,4 _	20,1 + 1,1 _	11,2 + 1,1 _	0
45 minutes	2	265 + 12,5 _	111 + 7,5 _	6,0 + 2,5 _	71,2 + 7,5 _	13,3 + 0,8 _	15,0 + 2,3 _	8,4 + 2,5 _	0

Les valeurs moyennes sont exprimées en µg de phosphore par g de tissu frais.

B) INFLUENCE DE L'ADRENALINE SUR LA VITESSE D'INCORPORATION DU PHOSPHATE RADIO-ACTIF DANS LES FRACTIONS PHOSPHORYLEES DE L'AORTE

L'inhibition du métabolisme aérobie de l'aorte, sous l'influence de l'adrénaline, est en relation avec la diminution notable du taux des dérivés riches en énergie comme en témoignent les résultats présentés dans le tableau XVIII.

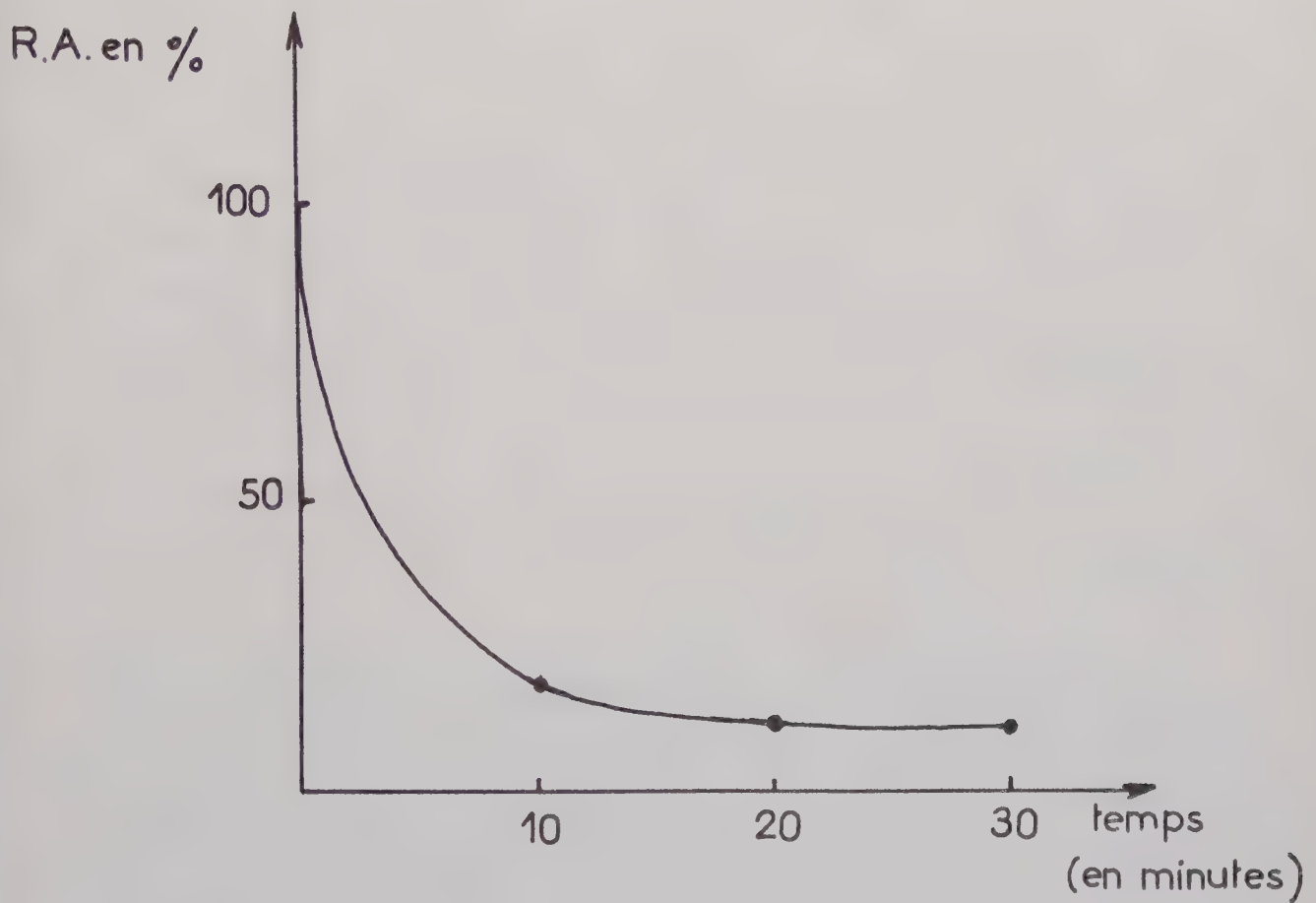
MATRAY et GAUTHERON (99) ont d'ailleurs montré, chez le rat, que l'évolution du taux des nucléotides adényliques dans le muscle utérin et le diaphragme est parallèle à la variation de l'intensité du métabolisme de ces deux muscles sous l'influence de cette hormone. Cette inhibition est liée vraisemblablement en particulier à la baisse du taux d'ADP, à condition que cette diminution ne soit pas compensée par une augmentation de la vitesse de renouvellement de ce nucléotide. Il nous a paru donc important de rechercher si il se produit, une variation de la vitesse d'incorporation du phosphate radio-actif dans les nucléotides adényliques et dans les différentes fractions phosphorylées de l'aorte et de mesurer la variation de la vitesse de renouvellement de ces composés sous l'influence de l'adrénaline.

1) Evolution de la radio-activité dans le sang en fonction du temps

Après injection intra-veineuse de phosphate radio-actif, la radio-activité diminue dans le sang suivant une courbe exponentielle, comme le montre la figure 7, où elle est exprimée en pourcentage de la radio-activité mesurée 30 secondes après l'injection. Au bout de 30 minutes, la courbe ne baisse plus que très lentement.

FIGURE 7

Cinétique de l'évolution de la radio-activité totale dans le sang de lapin, après injection de ^{32}P .



Si l'on mesure la proportion du phosphate radio-actif se trouvant dans le sang sous forme minérale par rapport au phosphate radio-actif total, on constate, comme le montre la figure 8, que cette proportion est toujours inférieure chez les animaux injectés d'adrénaline.

2) Influence de l'adrénaline sur le volume de l'espace extra-cellulaire de l'aorte

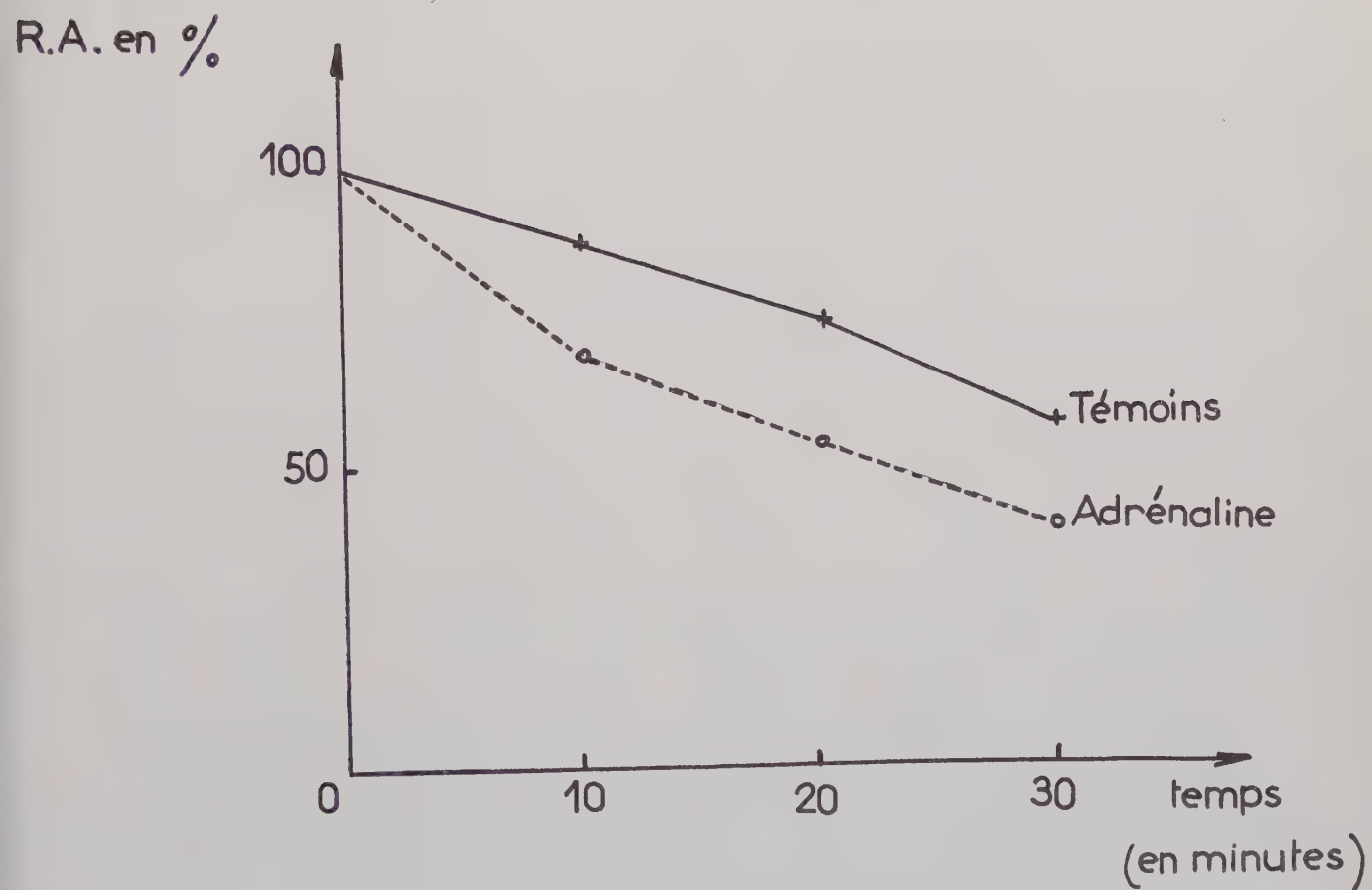
Pour pouvoir calculer le taux et l'activité spécifique du phosphate minéral intra-cellulaire, précurseur du phosphate des nucléotides, il faut déterminer avec la plus grande exactitude dans le tissu étudié la valeur de l'espace extra-cellulaire. En effet, pour des temps courts d'incubation, l'activité spécifique du phosphate minéral intra-cellulaire est très faible par rapport à celle du phosphate extra-cellulaire. L'erreur commise peut donc être importante si l'on n'a pas déterminé rigoureusement la valeur de l'espace liquidien extra-cellulaire.

Le tableau XXI montre les valeurs de l'espace extra-cellulaire de l'aorte thoracique totale obtenues avec différentes méthodes.

Nous voyons qu'en ce qui concerne les méthodes à l'inuline in vitro, il n'existe pas de différence notable entre les valeurs obtenues selon que la détermination a été effectuée à 0° ou à 37°. La légère différence constatée peut être rapprochée des variations enregistrées par VIDLAKOVA et KLEINZELLER (100) concernant l'hydratation totale du tissu en fonction de la température. Il est intéressant de noter que la valeur moyenne que nous avons obtenue (33,4 ml/100 g de poids frais) est très proche de celle obtenue par FRIEDMANN et coll. (101) pour l'aorte de rat, in vivo (31,9 ml/100 g de poids frais).

FIGURE 8

Pourcentage du phosphate radio-actif, se trouvant dans le sang sous forme minérale, après injection de ^{32}P



T A B L E A U XXI

VALEURS DE L'ESPACE EXTRA-CELLULAIRE DE L'AORTE THORACIQUE TOTALE.

CONDITIONS	IN VITRO			IN VIVO
TRACEUR	INULINE		³² P	THIOCYANATE
TEMPERATURE	0° C	37° C	37° C	-
NOMBRE DE CAS	6	37	4	7
$\bar{X} \pm sm$	29,4	33,4	32,0	40,8
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
(ml/100 g P. F.)	0,5	0,5	0,5	1,0

En revanche, la valeur obtenue avec le thiocyanate diffère sensiblement de celle mesurée avec l'inuline. Ceci peut s'expliquer par le fait que le thiocyanate, qui est une petite molécule, pénètre au moins en partie dans les cellules. En effet, au cours d'expériences parallèles, in vitro, nous avons noté une diffusion totale de ce composé, et même une concentration dans le secteur hydrique, puisque l'espace de diffusion obtenu est voisin de 100 % du poids frais.

Enfin la valeur déterminée par l'utilisation du phosphate radio-actif concorde parfaitement avec celle obtenue par

la méthode à l'inuline à 37°.

Dans le tableau XXII sont consignées les valeurs de l'espace extra-cellulaire en fonction de la topographie aortique.

On constate qu'il existe d'importantes variations suivant qu'il s'agit de la partie thoracique ou abdominale de l'aorte. En conséquence, il est difficile de mener à bien une expérimentation faisant intervenir l'espace extra-cellulaire si on utilise indifféremment divers fragments de tissu aortique. Cette raison nous a conduit à aborder cette partie de notre expérimentation en utilisant uniquement l'aorte thoracique totale, à l'exclusion de la partie abdominale.

Comme le font ressortir les résultats, rassemblés dans le tableau XXIII, l'adrénaline provoque in vitro et in vivo une augmentation statistiquement significative de la valeur de l'espace extra-cellulaire.

In vitro, la valeur de l'espace extra-cellulaire (E.E.C.) passe de 33,4 ml/100 g p.f. pour les témoins à 38 ml et à 41,6 ml pour des concentrations respectivement égales à 3×10^{-8} et $2,2 \times 10^{-7}$ M. In vivo, on note le même effet, puisque l'adrénaline utilisée à la concentration de $1,25 \times 10^{-7}$ mole/kg entraîne une augmentation de la valeur de l'E.E.C. d'environ 20 %. En utilisant, comme traceur, le phosphate radio-actif après injection intra-veineuse d'adrénaline nous notons une augmentation de l'E.E.C. qui passe de 32 ml à 38 ml, valeur identique à celle obtenue par la méthode à l'inuline (Figure 9).

GAUTHERON et MORELIS (102) ont constaté également cette augmentation de la valeur de l'E.E.C. sous l'influence de l'adrénaline dans le diaphragme, chez le rat.

T A B L E A U XXII

VALEUR NORMALE ET VARIATIONS TOPOGRAPHIQUES DE L'ESPACE DE
DIFFUSION DE L'INULINE IN VITRO A 37° C

ORGANE	NOMBRE	$\bar{X} \pm sm$	F	F 0,05	F 0,01	S (°)
AORTE THORACIQUE TOTALE	37	33,4 ± 0,5				
CROSSE AORTIQUE	10	33,8 ± 0,8	12,7	251,0	6286,0	-
AORTE THORACIQUE SUPERIEURE	10	32,3 ± 1,5	1,4	251,0	6286,0	-
AORTE THORACIQUE INFERIEURE	10	39,1 ± 1,1	23,7	4,1	7,2	++
AORTE ABDOMINALE SUPERIEURE	10	49,5 ± 2,2	112	4,1	7,2	++
AORTE ABDOMINALE INFERIEURE	10	53,4 ± 1,7	218	4,1	7,2	++

(°) S : Signification. Les valeurs de F sont calculées par rapport à la valeur moyenne 33,4 (Aorte Thoracique Totale).

T A B L E A U XXIII
ACTION DE L'ADRENALINE SUR L'ESPACE DE DIFFUSION
DE L'INULINE, IN VITRO à 37°C

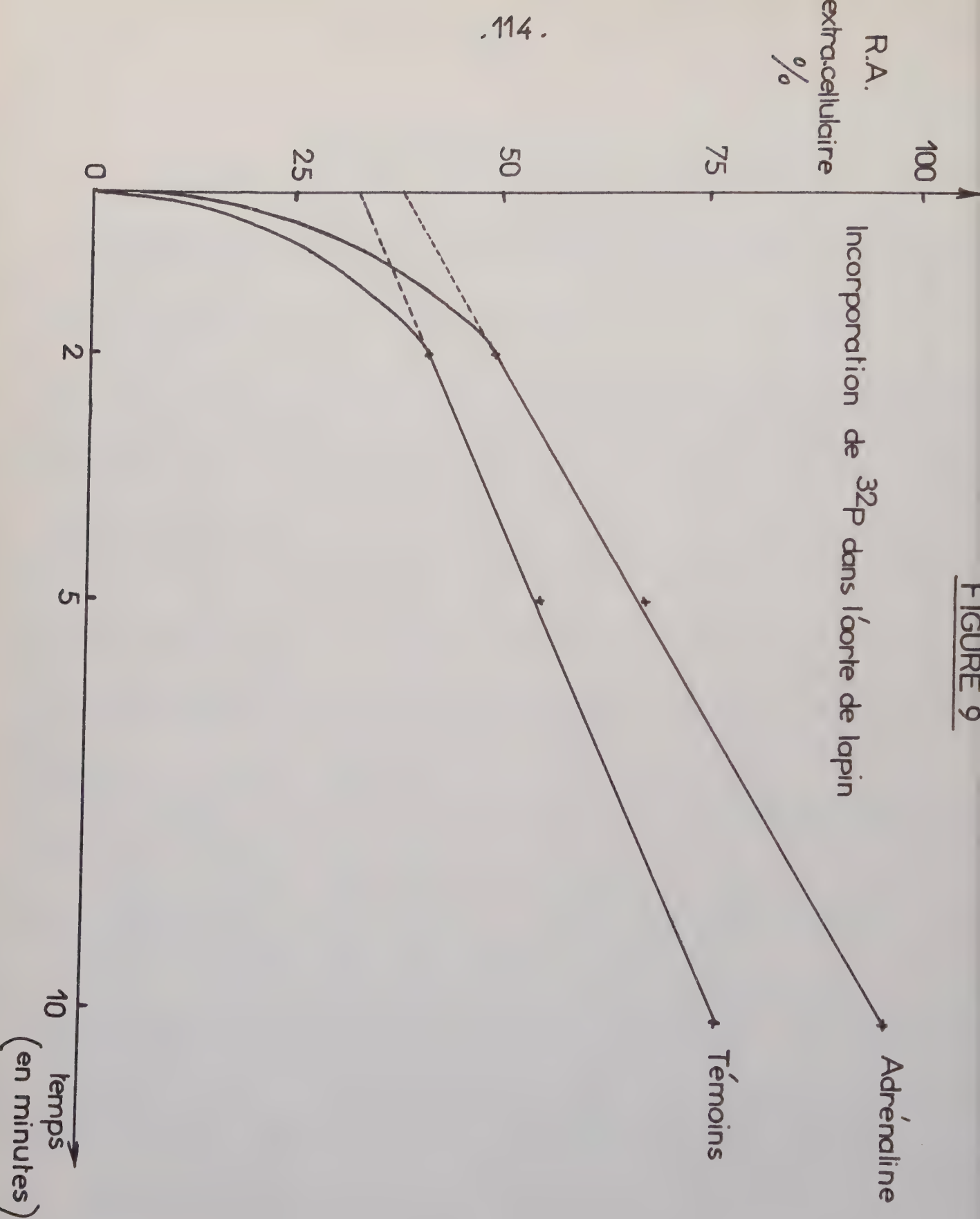
		IN VITRO		IN VIVO
DOSE	0	3×10^{-8} M	$2,2 \times 10^{-7}$ M	$1,25 \times 10^{-7}$ mole/kg
NOMBRE	37	10	10	10
$\bar{X} \pm sm$ (ml/100g p.f.)	33,4 $\pm$ 0,5	38,0 $\pm$ 1,4	41,6 $\pm$ 1,0	40,3 $\pm$ 1,4
F		13	74	29,13
F 0,05		4,06	4,06	4,06
F 0,01		7,24	7,24	7,24
SIGNIFICATION		++	++	++

Les valeurs de F sont calculées par rapport à la moyenne (33,4) obtenue pour l'aorte thoracique Totale.

3) Influence de l'adrénaline sur l'activité spécifique des différentes fractions phosphorylées de l'aorte

Nous avons étudié parallèlement l'évolution dans le temps du taux des fractions phosphorylées et des nucléotides adényliques selon le milieu d'incubation, la vitesse d'incorporation du phosphate radio-actif dans l'ATP, l'ADP et le NAD et la

FIGURE 9



vitesse de renouvellement des différentes fractions phosphorylées, comparativement chez des animaux normaux et soumis à l'action de l'adrénaline.

a) Cinétique d'évolution du taux des fractions phosphorylées et des nucléotides adényliques selon le milieu d'incubation

Les résultats sont présentés dans les figures 10 et 11. Les variations sont les suivantes :

Phosphate minéral : il augmente toujours chez les animaux témoins au cours de l'incubation, avec les deux milieux, alors qu'il diminue chez les animaux traités. Il faut tenir compte de cette différence importante pour le calcul des vitesses d'incorporation.

Phosphate résiduel : peu de variations sont notées, en fonction du temps chez les témoins, si ce n'est une augmentation du taux entre la deuxième et la cinquième minute, plus marquée en milieu bicarbonate. L'adrénaline modifie sensiblement cette évolution, quelque soit le milieu, en abaissant la teneur en phosphate résiduel.

Phosphate labile : la cinétique d'évolution est superposable pour les témoins et pour les traités à celle du phosphate résiduel.

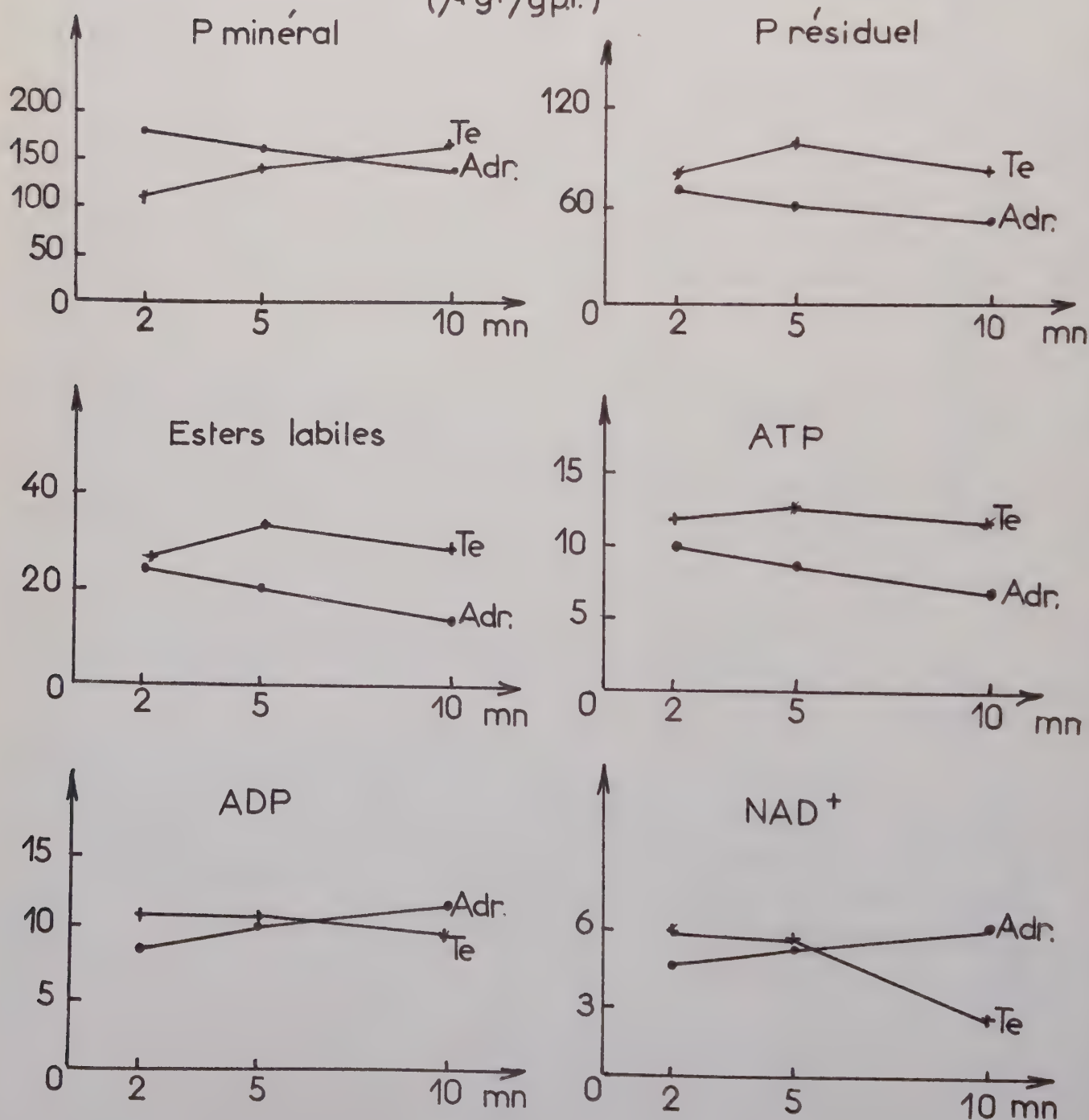
ATP : chez les témoins, le taux ne présente pas de modifications notables en milieu sérum alors qu'il augmente légèrement en milieu bicarbonate. Chez les traités, le taux d'ATP baisse régulièrement au cours de l'incubation ; cette diminution est surtout marquée en milieu bicarbonate.

FIGURE 10

Evolution des fractions phosphorylées et des nucléotides adéniques de l'aorte normale en fonction du temps

Milieu Sérum (4 essais)

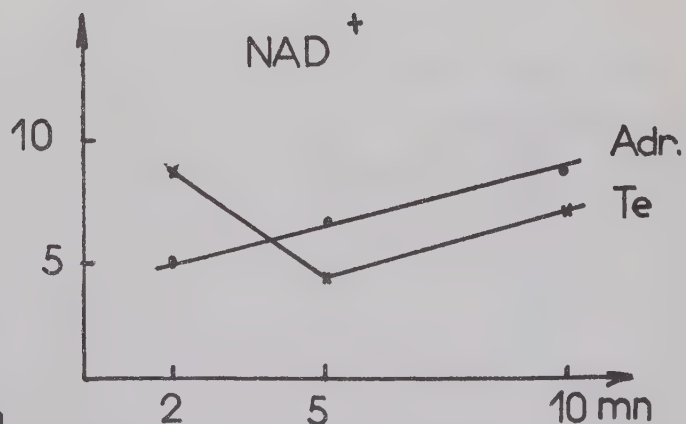
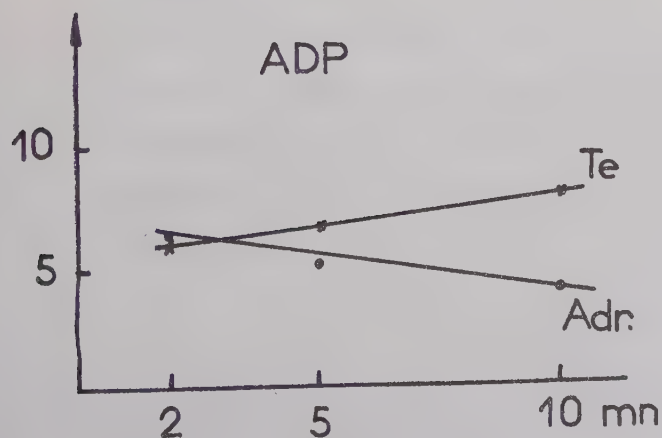
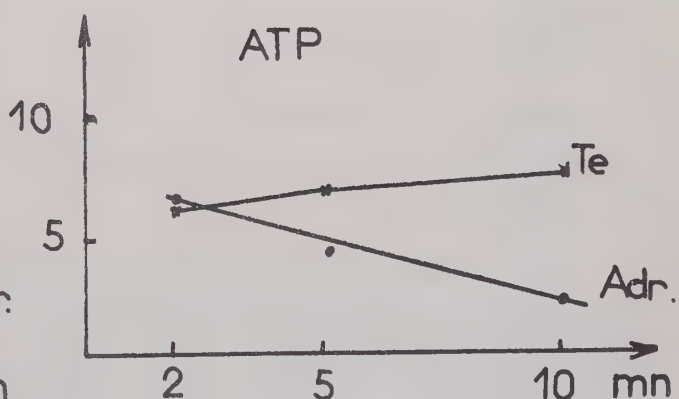
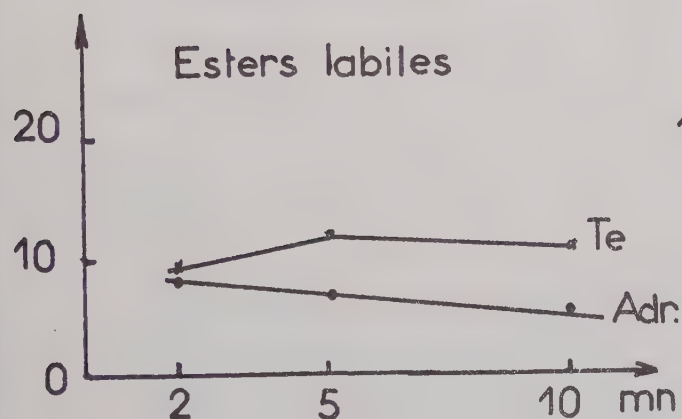
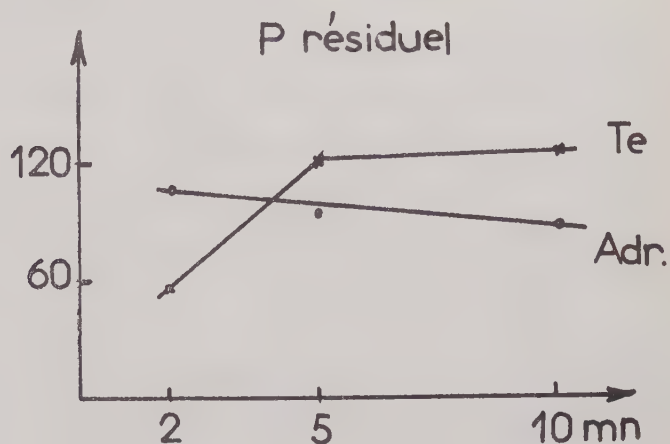
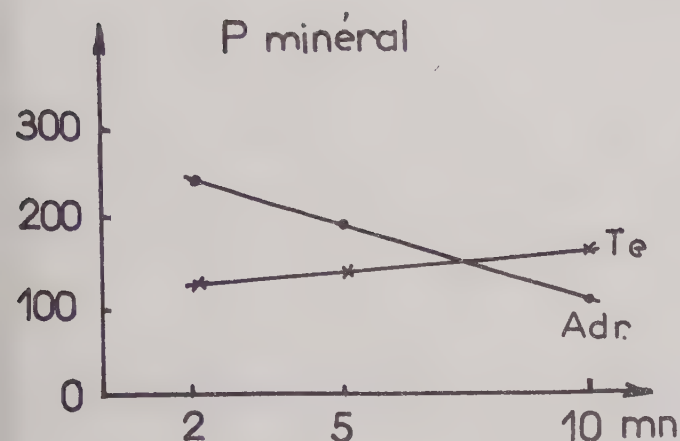
($\mu\text{gP/gpf.}$)



Evolution des fractions phosphorylées et des nucléotides adényliques de l'aorte normale en fonction du temps

Milieu Krebs Bicarbonate Na^+ (4 essais)

($\mu\text{gP/gp.f.}$)



ADP : chez les témoins le taux varie peu en milieu sérum mais augmente sensiblement en milieu bicarbonate. Chez les traités le taux d'ADP plus faible au départ en milieu sérum augmente régulièrement. En milieu bicarbonate on note au contraire une diminution régulière du taux d'ADP au cours de l'incubation.

NAD : chez les témoins, quelque soit le milieu, le taux de NAD diminue avec le temps ; cette variation est plus importante en milieu sérum. Chez les traités, le taux de NAD plus faible que chez les témoins, augmente avec le temps, dans les deux milieux. Il y a donc une resynthèse de NAD au cours de l'incubation, comme le confirment les mesures d'incorporation du ^{32}P dans ce coenzyme.

b) Vitesse d'incorporation du phosphate radio-actif dans l'ATP, l'ADP et le NAD

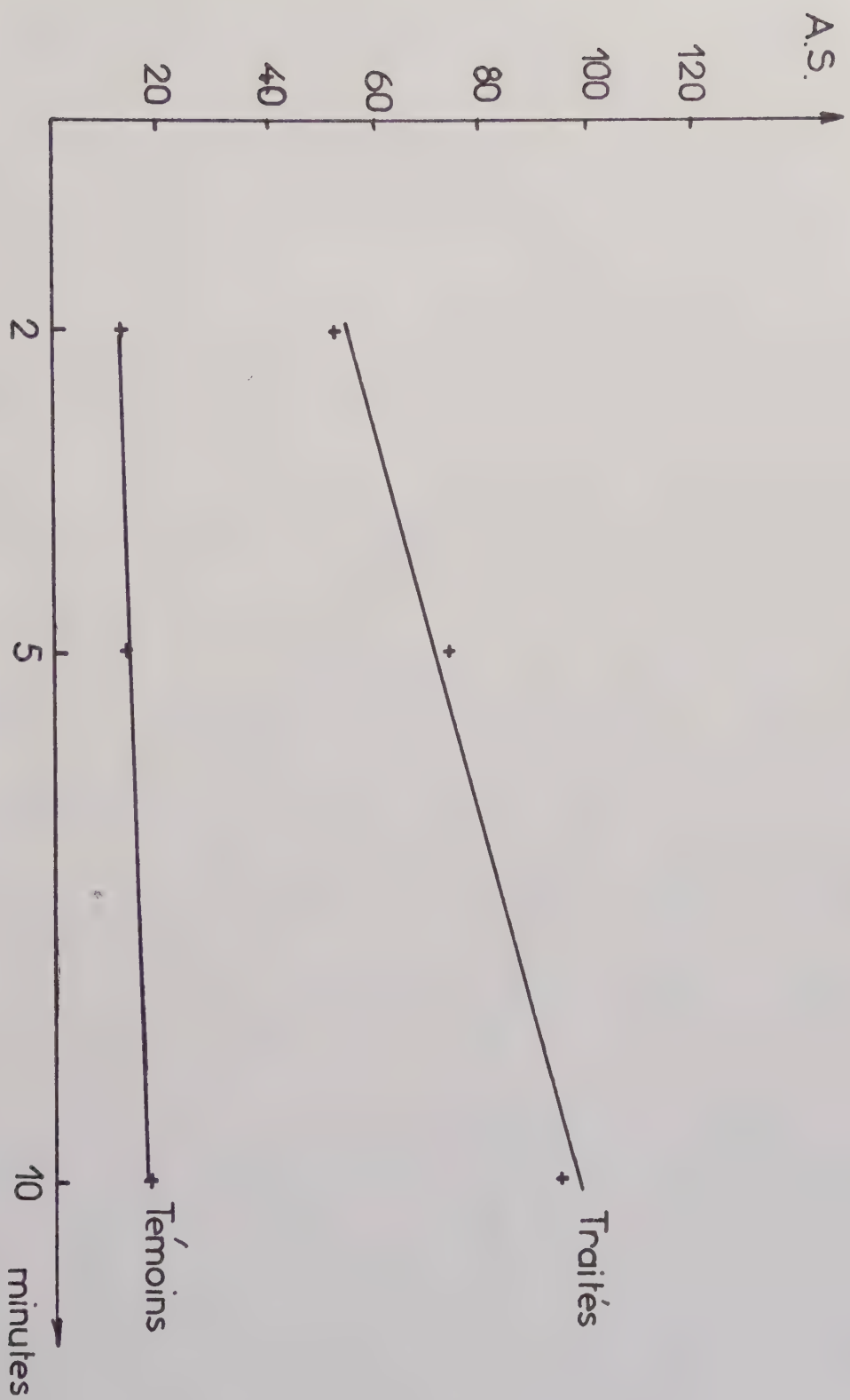
Elle est déterminée par l'étude cinétique des variations de l'activité spécifique de chacun des nucléotides en fonction du temps. Les animaux sont sacrifiés dix minutes après l'injection d'adrénaline, temps d'action optimum pour que se manifeste l'effet maximum de l'adrénaline sur le taux des nucléotides de l'aorte.

Afin de pouvoir déterminer l'activité spécifique des nucléotides, on opère selon le protocole décrit au chapitre I, (paragraphe J b 5) sur des fractions aliquotes permettant d'effectuer simultanément le dosage et le comptage des nucléotides.

Les résultats sont représentés sur les figures 12 et 13. Dans les conditions opératoires précédemment décrites, les trois phosphates de l'ATP ont une vitesse de marquage très différente. En effet le premier groupe phosphoré (correspondant au phosphate

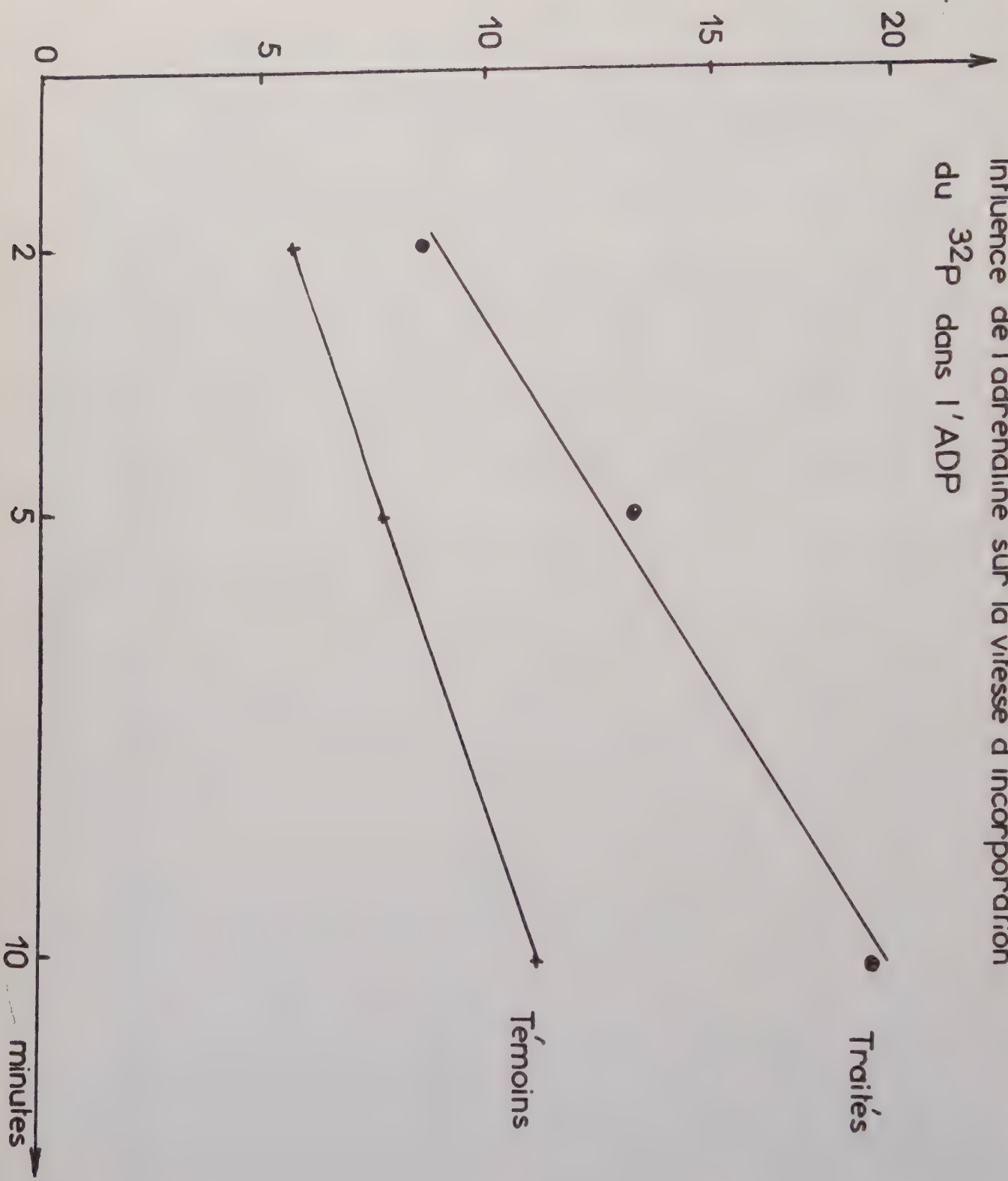
FIGURE 12

Influence de l'adrénaline sur la vitesse d'incorporation du ^{32}P dans l'ATP



A.S.

Influence de l'adrénaline sur la vitesse d'incorporation
du ^{32}P dans l'ADP



de l'AMP) n'est jamais marqué, alors que le second (correspondant au phosphate terminal de l'ADP) se marque beaucoup plus lentement que le phosphate terminal de l'ATP. Dans tous les cas les injections d'adrénaline augmentent de façon très nette la vitesse d'incorporation du ^{32}P dans l'ATP (figure 12) et l'ADP (figure 13).

En ce qui concerne le NAD, la vitesse d'incorporation du ^{32}P est plus lente que l'ADP et l'ATP, mais elle est également stimulée par l'adrénaline.

c) Vitesse de renouvellement des fractions phosphorylées et des nucléotides de l'aorte

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau XXIV.

1 - Phosphate intra-cellulaire

Effet du milieu : marquage plus rapide en milieu sérum qu'en milieu KREBS RINGER bicarbonate.

Effet de l'adrénaline : elle ralentit de façon significative le marquage du phosphate intra-cellulaire dans les deux milieux.

Significations des différences observées entre témoins et traités.

	2 mn	5 mn	10 mn
KREBS RINGER bicarbonate	$P < 0,001$	$P < 0,01$	$P < 0,01$
SERUM	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$

TABLEAU XXIV

Vitesse de renouvellement des fractions phosphorylées de l'acide. Influence de l'adrénaline.

MILIEUX	Krebs Ringer Bicarbonate de Sodium						Sérum					
TEMPS	2 mn		5 mn		10 mn		2 mn		5 mn		10 mn	
ADRENALINE	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+
P intra-cellulaire (E)	0,7	0,2	1,5	0,6	2,4	1,2	1,7	0,7	2,8	1,1	8,7	2,1
P minéral (E)	1,4	0,9	2,1	1,3	2,9	1,9	5,7	5,3	8,6	6,9	14,9	11,7
P total (E)	0,6	0,8	0,9	1,1	1,3	1,6	2,7	3,5	4,4	5,1	5,7	7,2
P résiduel (E)	1,1	1,2	1,6	1,7	2,1	2,5	0,2	0,4	0,5	0,8	0,9	1,2
P labile (E)	0,17	0,10	0,11	0,16	0,17	0,25	0,10	0,14	0,15	0,20	0,21	0,31
ATP ₂ (E).....	0,15	0,17	0,18	0,21	0,22	0,31	0,11	0,13	0,17	0,23	0,25	0,36
ATP ₂ (I).....	3,9	5,4	4,2	6,7	4,3	6,9	2,4	2,3	2,5	2,9	3,1	4,8
ADP ₂ (E).....	0,06	0,09	0,11	0,16	0,17	0,24	0,05	0,07	0,08	0,11	0,12	0,19
ADP ₂ (I).....	2,1	3,8	2,4	5,2	2,9	5,9	1,1	1,2	1,3	1,7	1,4	2,7
AMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(E).....	0	0	0,019	0,065	0,025	0,087	0	0	0,02	0,036	0,044	0,061
(I).....	0	0	0,27	0,96	0,32	1,8	0	0	0,3	0,48	0,35	0,78

Les valeurs moyennes (4 expériences) correspondent à la radio-activité spécifique exprimée en pourcentage par rapport à celle du Phosphate Intra (I) et Extra-cellulaire (E).

2 Radio-activité spécifique du P terminal. La signification des résultats est donnée dans le texte (p. 121 à 125)

2 - Phosphate minéral

Effet du milieu : marquage plus rapide en milieu sérum.

Effet de l'adrénaline : elle ralentit le marquage dans les deux milieux, mais cet effet est moins marqué qu'en ce qui concerne le phosphate intra-cellulaire.

Signification

	2 mn	5 mn	10 mn
KREBS RINGER bicarbonate	$P = 0,02$	$P = 0,01$	$P < 0,01$
SERUM	$0,02 < P < 0,05$	$0,001 < P < 0,01$	$P < 0,01$

3 - Phosphore total

Effet du milieu : marquage plus rapide en milieu sérum.

Effet de l'adrénaline : elle augmente significativement le marquage, surtout en milieu sérum.

Signification

	2 mn	5 mn	10 mn
KREBS RINGER bicarbonate	$P = 0,05$	$P = 0,05$	$0,02 < P < 0,05$
SERUM	$P < 0,01$	$P < 0,001$	$P < 0,001$

4 - Phosphore résiduel

Effet du milieu : marquage plus rapide en milieu KREBS RINGER bicarbonate.

Effet de l'adrénaline : elle augmente la vitesse de marquage dans les deux milieux. L'effet maximum se manifeste à la dixième minute d'incubation, surtout en milieu sérum.

Signification

	2 mn	5 mn	10 mn
KREBS RINGER bicarbonate	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P = 0,02$
SERUM	$0,02 < P < 0,05$	$P < 0,01$	$P < 0,01$

5 - Phosphore labile

Effet du milieu : marquage plus rapide en milieu sérum.

Effet de l'adrénaline : elle augmente la vitesse de marquage dans les deux milieux.

Signification

	2 mn	5 mn	10 mn
KREBS RINGER bicarbonate	$P < 0,001$	$0,02 < P < 0,05$	$P = 0,01$
SERUM	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$

Il faut noter que dans les deux milieux le phosphate labile, représenté essentiellement par la phosphocréatine, n'est pas encore en équilibre avec le phosphate terminal de l'ATP après 10 minutes d'incubation, chez les témoins comme chez les traités.

6 - ATP : on a calculé la vitesse de marquage du phosphate γ terminal

Effet du milieu : la vitesse de marquage est plus rapide en milieu bicarbonate.

Effet de l'adrénaline : elle augmente de façon significative dans les deux milieux la vitesse de renouvellement de l'ATP.

Signification

	2 mn	5 mn	10 mn
KREBS RINGER bicarbonate	$P = 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,001$
SERUM	$0,02 < P < 0,05$	$P = 0,01$	$P < 0,01$

7 - ADP. On a calculé la vitesse de marquage du phosphate β .

Effet du milieu : la vitesse de marquage est plus rapide en milieu bicarbonate.

Effet de l'adrénaline : elle augmente significativement la vitesse de renouvellement du phosphate β de l'ADP dans les deux milieux.

Signification

	2 mn	5 mn	10 mn
KREBS RINGER bicarbonate	$P = 0,02$	$0,001 < P < 0,01$	$P < 0,001$
SERUM	$P < 0,01$	$P < 0,001$	$P < 0,01$

8 - NAD. L'incorporation du phosphate radio-actif est lente dans les deux milieux et ne débute qu'après deux minutes d'incubation.

Effet du milieu : la synthèse est sensiblement plus rapide en milieu sérum.

Effet de l'adrénaline : elle augmente significativement la vitesse de renouvellement. Cet effet est plus marqué en milieu bicarbonate.

Signification

	2 mn	5 mn	10 mn
KREBS RINGER bicarbonate	non marqué	$0,001 < P < 0,01$	$P < 0,001$
SERUM	non marqué	$P < 0,001$	$P < 0,01$

9 - AMP. Quel que soit le temps d'incubation et le milieu le phosphate de l'AMP n'est jamais marqué.

Il est intéressant de rapprocher l'ensemble de ces résultats de ceux obtenus par GAUTHERON et MORELIS (102) dans le diaphragme du rat. Ces auteurs ont constaté des effets du même type sur les fractions phosphorylées sous l'influence de l'adrénaline. Les résultats que nous avons obtenus dans l'aorte, résultats qui rejoignent ceux des auteurs pré-cités, acquis à partir du muscle, plaident en faveur d'une unicité d'action de l'adrénaline, au moins en ce qui concerne les fractions phosphorylées, au niveau de tissus aussi différents que l'aorte et le diaphragme.

De plus, nous avons pu constater, en analysant systématiquement les milieux, aux différents temps, avant et après incubation, qu'il existe une diffusion d'AMP et surtout le NAD du tissu aortique dans le milieu d'incubation. Ce fait, très difficile à évaluer en milieu sérum est très net en milieu bicarbonate. Le sérum de lapin contient en effet du NAD ($33 \mu\text{g/ml}$ de sang total ; $0,38 \mu\text{g/ml}$ de sérum soit $0,63 \mu\text{mole/ml}$) et de l'AMP ($0,76 \mu\text{g/ml}$ soit environ $0,85 \mu\text{mole/ml}$. Valeurs en μg de Phosphore /ml).

En milieu bicarbonate, donc exempt de nucléotides au temps zéro, on voit apparaître dans le milieu, entre la cinquième et la dixième minute d'incubation, à l'état de traces de l'AMP et du NAD.

Chez les traités cette diffusion de l'AMP et du NAD dans le milieu d'incubation augmente notablement, sous l'influence de l'adrénaline.

Ceci est en accord avec la diminution significative du taux des nucléotides adényliques, observée après action de cette hormone, au niveau du tissu aortique (Cf. tableau XVIII) et confirme la perte du noyau adénylique par ce tissu.

CHAPITRE V

INFLUENCE DU REGIME ATHEROGENE SUR LE METABOLISME AORTIQUE

1- EFFETS DU REGIME ATHEROGENE SUR LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES IN VITRO

a) Incorporation de ^{14}C -Leucine dans les protéines ribosomales

Toutes nos expériences ont été conduites parallèlement à partir du tissu aortique et hépatique, choisi comme système de référence. Le tableau XXV résume les résultats obtenus concernant l'incorporation de ^{14}C -Leucine dans les protéines ribosomales du foie et de l'aorte chez les animaux normaux et soumis à un régime athérogène.

On constate, après 3 mois de régime, une diminution significative du taux d'incorporation de ^{14}C -Leucine dans les protéines ribosomales de l'aorte chez les animaux traités. La même constatation s'applique au tissu hépatique. Ce fait est à rapprocher de l'abaissement significatif du taux des nucléotides adényliques, ATP en particulier, (Cf tableau XXXII) et du GTP (Cf tableau XXXIII) observée dans ce tissu, après 3 mois de régime hypercholestérolé.

b) Incorporation de ^{14}C -Proline dans le collagène insoluble

Les résultats sont présentés dans les tableaux XXVI et XXVII.

T A B L E A U XXV

INCORPORATION DE ^{14}C -LEUCINE DANS LES PROTEINES RIBOSOMALES DE
FOIE ET D'AORTE DE LAPINS NORMAUX ET SOUMIS A UN REGIME ATHEROGENE

ORGANES	Nb DE CAS	TEMOINS	TRAITES	VALEUR DE P
AORTE	8	378,7 ± 49,2	240,5 ± 32,1	P < 0,01
FOIE	8	1206,8 ± 75,5	1009,0 ± 70,8	P < 0,01

Les valeurs moyennes, exprimées en coups/mn/mg de Protéines
sont suivies de l'erreur-type.

T A B L E A U XXVI

INCORPORATION DE ^{14}C -PROLINE DANS LE COLLAGENE INSOLUBLE APRES
UN MOIS DE REGIME ATHEROGENE

ORGANES	Nb de CAS	$\mu\text{moles/g}$	cps/mn/g	ACTIVITE SPECIFIQUE
AORTE	10	18,9 $\pm$ 2,7	1.056 $\pm$ 252	70,8 $\pm$ 28,5
FOIE	10	0,7 $\pm$ 0,2	2.257 $\pm$ 1.089	2692 $\pm$ 862,8

T A B L E A U XXVII

ACTIVITES INCORPORATRICES COMPAREES ENTRE LAPINS NORMAUX ET TRAITES

ORGANES	ACTIVITE SPECIFIQUE		VALEUR de P
	TEMoins	TRAITES	
AORTE	161 $\pm$ 56	70,8 $\pm$ 28,5	$P < 0,01$
FOIE	2136 $\pm$ 695	2692 $\pm$ 862,8	$P > 0,05$

On note également une diminution significative du taux d'incorporation de la Proline dans le collagène insoluble de l'aorte chez les animaux soumis à un régime athérogène.

En revanche, il n'existe pas de différence du taux d'incorporation dans le tissu hépatique.

L'ensemble de ces données expérimentales témoigne d'un ralentissement de l'incorporation d'acides aminés et par conséquent du renouvellement des protéines de l'intima et de la média de la paroi aortique au cours du développement du processus athérogène. Ces faits confirment la réduction de la biosynthèse des protéines telle qu'elle ressort de l'étude des activités enzymatiques (5, 13, 14), et sont à rapprocher des résultats de MANDEL et coll.(11) portant sur l'incorporation de ³⁵S Méthionine dans les aortes de bovidés jeunes et âgés.

2 - EFFETS DU REGIME ATHEROGENE SUR LES FRACTIONS PHOSPHORYLEES ET LES NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DE L'AORTE ET DU FOIE

A) Tissu aortique

a) Evolution des fractions phosphorylées

Les résultats sont présentés dans le tableau XXVIII.

- Phosphore acidosoluble total. Chez les animaux consanguins on constate dès un mois de traitement une diminution significative qui s'accroît au cours du traitement et atteint 53 p. 100 à 3 mois et demi. Chez les albinos, la diminution est moins notable et chez les lapins de race commune elle est plus lente. Dans tous les cas la diminution est très significative à trois mois et demi de traitement.

- Phosphate minéral vrai. Chez les lapins de race commune et chez les consanguins on constate une augmentation du phosphate minéral au cours du premier mois de régime (très signi-

TABLEAU XXVIII

Fractions phosphorylées acidosolubles de l'aorte. Evolutions sous l'influence du traitement athérogène

P Total				P Minéral				P Labile				P Résiduel				
	Te	1 m	2 m	3,5m	Te	1 m	2 m	3,5m	Te	1 m	2 m	3,5m	Te	1m	2 m	3,5m
X + — sm 2	1°/ Lapins de race commune : 10 expériences															
	293	284	275	168	114	126	108	68	5	5	1,2	2,4	76	93	103	49
	+ — 12,6	+ — 9,2	+ — 26,3	+ — 9,2	+ — 8,6	+ — 5,7	+ — 12,0	+ — 4,2	+ — 1,8	+ — 0,7	+ — 1,2	+ — 1,1	+ — 7,5	+ — 5,2	+ — 12,3	+ — 8,1
X + — sm 2	2°/ Lapins albinos : 10 expériences															
	290			210	101			79	11			5	83			52
	+ — 8,6			+ — 13,8	+ — 9,2			+ — 8,5	+ — 1,8			+ — 1,5	+ — 12,9			+ — 7,8
X + — sm 2	3°/ Lapins consanguins : 10 expériences															
	303	277	162	142	116	148	93	62	12	5	14	2	74	92	29	35
	+ — 6,5	+ — 9,7	+ — 16	+ — 8,9	+ — 3,4	+ — 7,1	+ — 9,7	+ — 6,8	+ — 0,8	+ — 1,3	+ — 1,9	+ — 1,1	+ — 4,5	+ — 4,6	+ — 3,0	+ — 5,5

2 Microgrammes de phosphore par gramme de poids frais

Te : Animaux témoins

1 m, 2 m, 3,5 m : Animaux traités respectivement pendant 1 mois, 2 mois et 3 mois et demi.

ficative chez les consanguins) puis une diminution progressive qui atteint 45-47 p. 100 après trois et demi. Les albinos semblent moins affectés.

Phosphate labile. Après trois mois et demi de régime on constate une diminution importante, très significative chez les consanguins.

Phosphate résiduel. Au cours du premier mois de traitement on observe une augmentation suivie d'une chute très marquée (de 36 à 53 p. 100) et très significative chez les animaux de race commune et les consanguins après trois et demi de traitement.

b) Evolution des nucléotides

Les résultats sont présentés dans le tableau XXIX.

ATP : Dès un mois de traitement on observe une diminution de l'ATP qui s'accroît en fonction du temps et devient très significative. Après trois mois et demi de régime les teneurs en ATP tombent à 28 p. 100, 24 p. 100 et 10 p. 100 des teneurs normales, respectivement chez les lapins de race commune, les albinos et les animaux consanguins. Les consanguins sont donc les plus sensibles au traitement.

ADP : Le taux d'ADP baisse régulièrement dans le temps. Chez les animaux consanguins l'évolution est très brutale dès le premier mois et le taux se stabilise vers 18 p. 100 de la valeur normale dès le deuxième mois de régime. Chez les animaux de race commune et chez les albinos la teneur tombe à environ 50 p. 100 du taux normal après trois mois et demi de traitement.

TABEAU XXIX

Variations des nucléotides adényliques libres de l'aorte (intima + média) sous l'influence du traitement athérogène

	ATP				ADP				AMP	ATP + ADP + AMP				NAD			
	Te	1 m	2 m	3,5m	Te	1 m	2 m	3,5m		Te	1 m	2 m	3,5m	Te	1 m	2 m	3,5m
	1°/ Lapins de race commune : 10 expériences									2°/ Lapins albinos : 10 expériences							
X + - sm 2	14,7 + - 1,8	11,0 + - 0,4	9,4 + - 1,1	4,3 + - 1,1	24,6 + - 1,6	21,8 + - 0,8	15,0 + - 2,5	12,9 + - 3,8	0	39,3 + - 2,9	32,8 + - 1,3	24,4 + - 2,8	17,2 + - 1,5	10,9 + - 1,2	10,9 + - 0,7	8,0 + - 0,7	5,8 + - 1,2
X + - sm 2	15,9 + - 1,0			3,8 + - 1,0	26,6 + - 1,9			12,2 + - 0,9	0	42,5 + - 2,4			16,0 + - 3,1	12,0 + - 1,4			4,9 + - 0,7
X + - sm 2	3°/ Lapins consanguins : 10 expériences									3°/ Lapins consanguins : 10 expériences							
	19,2 + - 1,0	11,1 + - 0,5	2,9 + - 0,7	1,9 + - 0,5	31,1 + - 1,6	16,8 + - 1,4	5,6 + - 0,9	5,6 + - 1,1	0	50,4 + - 2,6	28,0 + - 1,6	8,5 + - 1,6	7,4 + - 1,6	14,0 + - 0,4	6,3 + - 1,1	3,8 + - 1,1	3,8 + - 0,8

2 Micromoles par 100 grammes de poids frais.

Te : Animaux témoins

2 Micromoles par 100 grammes de poids frais.

Te : Animaux témoins

1 m, 2 m, 3,5 m : Animaux traités respectivement pendant 1 mois, 2 mois et 3 mois et demi.

AMP : Malgré les diminutions importantes des taux d'ATP et d'ADP on ne constate jamais d'apparition de quantités dosables d'AMP libre.

Somme ATP + ADP + AMP : Elle diminue régulièrement avec le traitement ; la baisse est significative dès le premier mois de régime. Chez les animaux consanguins la teneur globale des nucléotides est réduite à 14 p. 100 de sa valeur normale après trois mois et demi de régime.

NAD : Chez les animaux de race commune la teneur en ADN baisse dès deux mois de régime et la diminution ne devient significative qu'après trois mois et demi. Chez les albinos la diminution est très significative à trois mois et demi de régime. En revanche, chez les animaux consanguins le taux de NAD diminue très significativement dès le premier mois de régime et tombe à 26 p. 100 de la valeur normale après trois mois et demi.

c) Variations du rapport ATP/ADP en fonction de la durée du régime athérogène.

Le tableau XXX montre les variations observées.

Après trois mois et demi de régime ce rapport est notablement plus faible (il passe de 0,6 à 0,33-0,48).

d) Influence de l'adrénaline sur les fractions phosphorylées et adényliques de l'aorte athéromateuse

Les résultats sont présentés dans le tableau XXXI et la figure 14. On voit que chez les animaux athéroscléreux, le taux des fractions phosphorées est significativement plus faible que chez les animaux normaux, qu'ils soient injectés ou non

T A B L E A U X X X

VARIATIONS DU RAPPORT ATP/ADP DANS LE TISSU AORTIQUE AU COURS
DU REGIME ATHEROSCLEROGENE

ANIMAUX	TEMUINS	DUREE DU TRAITEMENT		
		1 mois	2 mois	3 mois
RACE COMMUNE	0,60	0,50	0,63	0,33
ALBINS	0,60	--	--	0,48
CONSANGUINS	0,62	0,66	0,52	0,34

TABLEAU XXXI

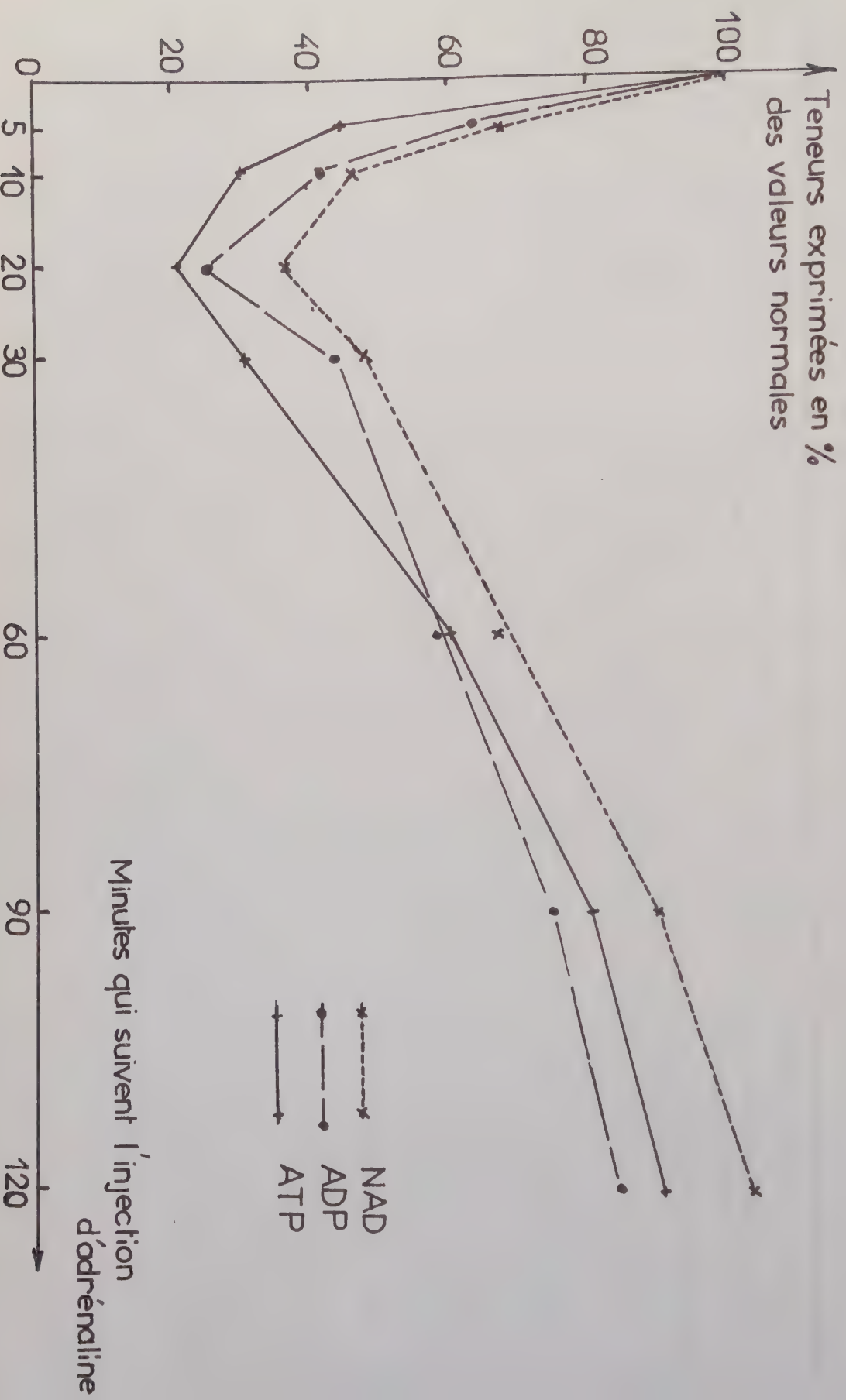
Variation des fractions phosphorylées de l'aorte de Lapins athéroscléreux sous l'influence d'une injection intraveineuse d'adrénaline (46 µg/Kg), dans le temps qui suit l'injection.

Nombre de cas	Temps en minutes	P total	P minéral	P labile	P résiduel	ATP	ADP	NAD
5	0 (athéroscléreux non injectés)	193 ₋ 12	68 + 5,2	5,5 ₋ 0,9	43 +4,5	4,5 ₋ 0,6	6,7 ₋ 0,5	3,8 ₋ 0,3
6	5	172 ₋ 8	90 + 6	3 +0,8	35 +2,8	2 +0,3	4,2 ₋ 0,5	2,5 ₋ 0,6
5	10	165 ₋ 28,7	95 + 5,9	1,8 ₋ 0,5	29,5 ₋ 3	1,4 ₋ 0,4	2,8 ₋ 0,3	1,7 ₋ 0,2
5	20	142 ₋ 8,1	96,2 + 9,2	1,9 ₋ 0,6	23,5 ₋ 2,3	1,1 ₋ 0,4	1,6 ₋ 0,5	1,3 ₋ 0,4
4	30	159 ₋ 7,9	92 + 7,5	2,4 ₋ 1,4	27 +2	1,5 ₋ 0,2	3,1 ₋ 0,7	1,7 ₋ 0,7
4	60	168 ₋ 8	83 +15,5	2,2 ₋ 0,8	35 +8,9	2,7 ₋ 0,9	3,9 ₋ 1	2,3 ₋ 0,9
4	90	176 ₋ 24	76 +13	2,4 ₋ 1,4	30 +2,7	3,6 ₋ 0,9	5,3 ₋ 0,4	3,5 ₋ 0,7
4	120	185 ₋ 18	66 + 8,1	3,2 ₋ 1,2	44 +8,2	3,9 ₋ 0,6	6,1 ₋ 0,5	4,1 ₋ 0,6

Les résultats sont exprimés en µg de phosphore par g de tissu frais.
Signification des résultats : voir dans le texte les résultats du test t. (page 139 et 140).

FIGURE 14

Influence de l'adrénaline sur l'évolution des nucleotides de l'aorte de lapins athéroscléreux



d'adrénaline. Si l'on compare les chiffres normaux (tableau XVIII) et ceux des animaux traités (tableau XXXI), la signification des différences, après application du test t, est la suivante :

	ATP	ADP	NAD
Animaux non injectés	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
5 mn après l'injection d'adrénaline	$0,001 < P < 0,01$		
10 mn " "		$0,02 < P < 0,05$	$0,05 < P < 0,1$
20 mn " "	$P = 0,02$	$0,01 < P < 0,02$	$0,05 < P < 0,1$
30 mn " "	$P < 0,001$	$0,001 < P < 0,01$	$0,001 < P < 0,01$
60 mn " "	$0,001 < P < 0,01$		
90 mn " "	$0,001 < P < 0,01$	$P \ll 0,001$	$0,02 < P < 0,05$
120 mn " "	$P \ll 0,001$		$0,05 < P < 0,1$

L'adrénaline provoque chez ces animaux des effets du même type mais nettement plus marqués que ceux obtenus chez les normaux. Là aussi, l'effet maximum est obtenu à la vingtième minute qui suit l'injection. La régénération est plus lente que chez les animaux normaux.

La signification des résultats produits par l'adrénaline est la suivante :

	5 mn	10 mn	20 mn
Phosphore Total	--	--	$0,001 < P < 0,01$
Phosphate Minéral	$0,02 < P < 0,05$	$0,001 < P < 0,01$	$0,02 < P < 0,05$
Phosphore résiduel	$P < 0,001$	$0,02 < P < 0,05$	$0,001 < P < 0,01$
Phosphates labiles	--	$0,001 < P < 0,01$	$0,02 < P < 0,01$
ATP	$0,001 < P < 0,01$	$0,001 < P < 0,01$	$0,001 < P < 0,01$
ADP	$0,001 < P < 0,01$	$P < 0,001$	$P > 0,05$
NAD	--	--	--

	30 mn	60 mn	90 mn
Phosphore Total	--	--	--
Phosphate Minéral	$0,02 < P < 0,05$	--	--
Phosphore résiduel	$P = 0,02$	--	$P < 0,001$
Phosphates Labiles	--	$0,001 < P < 0,01$	$0,02 < P < 0,05$
ATP	$0,001 < P < 0,01$	$P > 0,05$	--
ADP	$0,001 < P < 0,01$	$0,01 < P < 0,02$	--
NAD	$0,01 < P < 0,02$	--	--

B) Tissu Hépatique

a) Evolution des fractions phosphorylées

Le tableau XXXII montre les résultats obtenus.

Chez les animaux traités on constate une variation significative du phosphate minéral, du phosphate labile et du phosphate résiduel, qui n'apparaît qu'après trois mois de régime athérogène. Les taux de phosphate minéral et de phosphate résiduel diminuent de façon significative, alors que le phosphate labile est augmenté. On note un taux important de phosphate total, mais la diminution observée chez les animaux traités n'est pas significative.

b) Evolution des nucléotides adényliques

Les résultats sont consignés dans le tableau XXXIII.

Dès le premier mois de régime, on constate une diminution significative du taux d'ATP (- 23 %) qui se maintient au cours du deuxième et troisième mois. A la fin du troisième mois le taux d'ATP ne représente plus que 70 % par rapport à la valeur normale. Le taux d'ADP subit une évolution du même genre, mais baisse de façon un peu moins nette, puisqu'il représente 80 %

TABLEAU XXXII

Evolution des fractions phosphorylées du foie chez le lapin soumis à un régime athéroène

Fractions	P TOTAL				P MINERAL				P LABILE				P RESIDUEL			
Régime	0	1m	2m	3m	0	1m	2m	3m	0	1m	2m	3m	0	1m	2m	3m
Cas	12	8	4	5	12	8	4	5	12	4	4	5	12	11	4	5
X $\pm$ sm	1421 + 61	1298 + 91	1236 + 131	1221 + 38	485 + 35	470 + 29	425 + 39	378 + 25	6,2 + 1,3	5,6 + 1,4	4,2 + 1,5	24,2 + 12,6	583 + 35	666 + 56	467 + 76	268 + 35
$\mu\text{gP/g PF}$																
F	-	1,38	2,06	4,10		1,12	1,21	6,85		0,80	1,80	4,96		2,64	2,96	36,6
F 0,05		4,41	4,60	4,54		4,41	4,60	4,54		4,60	245	4,54		248	4,60	4,54
F 0,01		8,28	8,86	8,68		8,28	8,86	8,68		8,86	6142	8,68		6208	8,86	8,68
Signification		-	-	-		-	-	+		-	-	+		-	-	++

1 m, 2 m, 3 m = 1 mois, 2 mois, 3 mois de traitement.

$\mu\text{gP/g PF}$ = microgrammes de Phosphore par gramme de poids frais.

TABEAU XXXIII

Evolution des nucléotides adényliques du foie chez le lapin soumis à un régime athéroène

Nucléotides	A T P				A D P				A M P				N A D ⁺			
	0	1m	2m	3m	0	1m	2m	3m	0	1m	2m	3m	0	1m	2m	3m
Régime																
Cas	13	11	4	14	13	11	4	14	13	11	4	14	13	11	4	14
X + sm µg P/gPF	138,0 + 8,4	105,7 + 6,7	104,2 + 5,1	95,6 + 4,8	94,4 + 4,0	87,7 + 8,7	78,5 + 5,9	74,7 + 4,9	53,4 + 4,2	65,0 + 6,7	35,5 + 8,0	55,9 + 4,0	56,5 + 3,7	55,8 + 9,7	63,2 + 9,8	46,2 + 1,6
X + sm µM/100 g pF	153,5 + 9,3	117,5 + 7,5	116,0 + 5,6	106,0 + 5,7	157,0 + 8,6	146,0 + 14,5	131,0 + 9,8	124,0 + 8,5	178,0 + 14,0	216,5 + 22,3	119 + 26,6	186 + 23,5	94,0 + 6,1	93,0 + 16,1	105,5 + 16,3	77,0 + 6,1
F	-	8,41	4,54	19,5	-	1,88	3,9	9,5	-	2,23	4,36	5,7	-	192	1,58	7,16
F 0,05	-	4,30	4,54	4,24	-	248	4,54	4,24	-	4,32	4,60	249	-	248	245	4,24
F 0,01	-	7,94	6,68	7,77	-	6208	8,68	7,77	-	8,02	8,86	6234	-	6208	6142	7,77
Signification		++	+	++		-	-	++		-	-	-		-	-	+

1 m, 2 m, 3 m = 1 mois, 2 mois, 3 mois de traitement.

µg P/gPF = microgrammes de Phosphore par gramme de poids frais.

µM/100 g PF = micromoles pour 100 grammes de poids frais.

de la valeur normale à la fin du traitement. Dans tous les cas, on note un taux appréciable d'AMP. Les valeurs obtenues sont peu modifiées chez les animaux traités. La présence nette d'AMP est un point intéressant à souligner, car elle s'oppose au taux extrêmement faible de ce nucléotide dans le tissu aortique. La teneur en NAD est importante et ne commence à diminuer qu'à la fin du troisième mois de traitement. Le rapport ATP/ADP (tableau XXXIV) varie faiblement sous l'influence du régime.

T A B L E A U XXXIV

VARIATIONS DU RAPPORT ATP/ADP DANS LE TISSU HEPATIQUE AU COURS
DU REGIME ATHEROSCLERUENE

RAPPORT ATP/ADP			
TEMOINS	1 mois	2 mois	3 mois
0,98	0,81	0,89	0,80

c) Evolution des nucléotides non adényliques

Les résultats sont rapportés dans le tableau
XXXV.

On observe, à la fin du troisième mois de régime, une augmentation très nette du taux d'IMP. Cette augmentation ne semble

pas être liée à une stimulation de l'activité désaminasique, étant donné que le taux d'AMP reste pratiquement constant. Le taux de CTP demeure inchangé. En revanche on constate une diminution marquée des taux de GTP et d'UTP.

T A B L E A U XXXV

EVOLUTION DES NUCLEOTIDES NON-ADENYLIQUES DU TISSU HEPATIQUE
AU COURS DE L'ATHEROSCLEROSE EXPERIMENTALE

Nbre de cas	NUCLEOTIDES	IMP	CTP	GTP	GDP	GMP	UTP
13	TEMOINS	49,0	12,0	14,0	17,0	36,0	17,0
		±	±	±	±	±	±
		3,5	1,3	1,2	1,4	2,8	1,9
9	TRAITES	77,0	12,0	9,0	18,0	25,0	12,0
		±	±	±	±	±	±
		6,8	2,0	1,1	1,8	3,0	1,6

Les valeurs moyennes, exprimées en μ moles pour 100 grammes de poids frais, sont suivies de l'erreur-type.

3 - EFFETS DU REGIME ATHEROGENE SUR L'ACTIVITE SPECIFIQUE DES FRACTIONS PHOSPHORYLEES DE L'AORTE

a) Variations de la valeur de l'espace extracellulaire

Les résultats sont consignés dans le tableau XXXVI.

T A B L E A U XXXVI

INFLUENCE DU REGIME ATHEROGENE SUR L'ESPACE DE DIFFUSION DE
L'INULINE IN VITRO A 37° C

REGIME	0	1 mois	2 mois	3 mois
Nombre de cas	37	11	14	13
$\bar{X} \pm sm$ ml/100 g P F	33,4 $\pm$ 0,5	35,4 $\pm$ 1,4	38,7 $\pm$ 1,6	39,1 $\pm$ 1,2
F	-	2,75	16,49	25,3
F 0,05	-	4,05	4,04	4,04
F 0,01	-	7,21	7,19	7,19
Signification		--	++	++

Comme le fait ressortir le tableau XXXVI, on constate que, sous l'influence d'un régime riche en cholestérol, il se produit une augmentation progressive de la valeur de l'espace extra-cellulaire au cours du régime.

Toutefois il faut noter que cette augmentation ne devient significative qu'après 2 mois de régime. Il est intéressant

de rapprocher cette augmentation, significative au deuxième mois, du fait que les lésions macroscopiques apparaissent en général au niveau de l'aorte entre la huitième et la onzième semaine de régime. Après trois mois de régime, l'augmentation enregistrée est de l'ordre de 15 %.

b) Cinétique d'évolution du taux des fractions phosphorylées au cours de l'incubation

Les résultats sont représentés dans la figure 15.

On observe les variations suivantes :

Phosphate Minéral. Il augmente régulièrement au cours de l'incubation.

Phosphate Résiduel. On note également une augmentation régulière du taux de phosphate résiduel en fonction du temps.

Phosphate Labile. Le taux de phosphate labile n'est pas modifié en fin d'incubation, bien que l'on note une augmentation entre la deuxième et la cinquième minute.

ATP. On enregistre une diminution, peu marquée, mais régulière du taux d'ATP en fonction du temps.

ADP. L'évolution est du même type mais beaucoup plus nette qu'en ce qui concerne le taux d'ATP.

NAD. Le taux de NAD est abaissé de plus de 40 % en fin d'incubation.

c) Influence du régime athérogène sur la vitesse de renouvellement des fractions phosphorylées et des nucléotides

Les résultats sont présentés dans le tableau XXXVII.

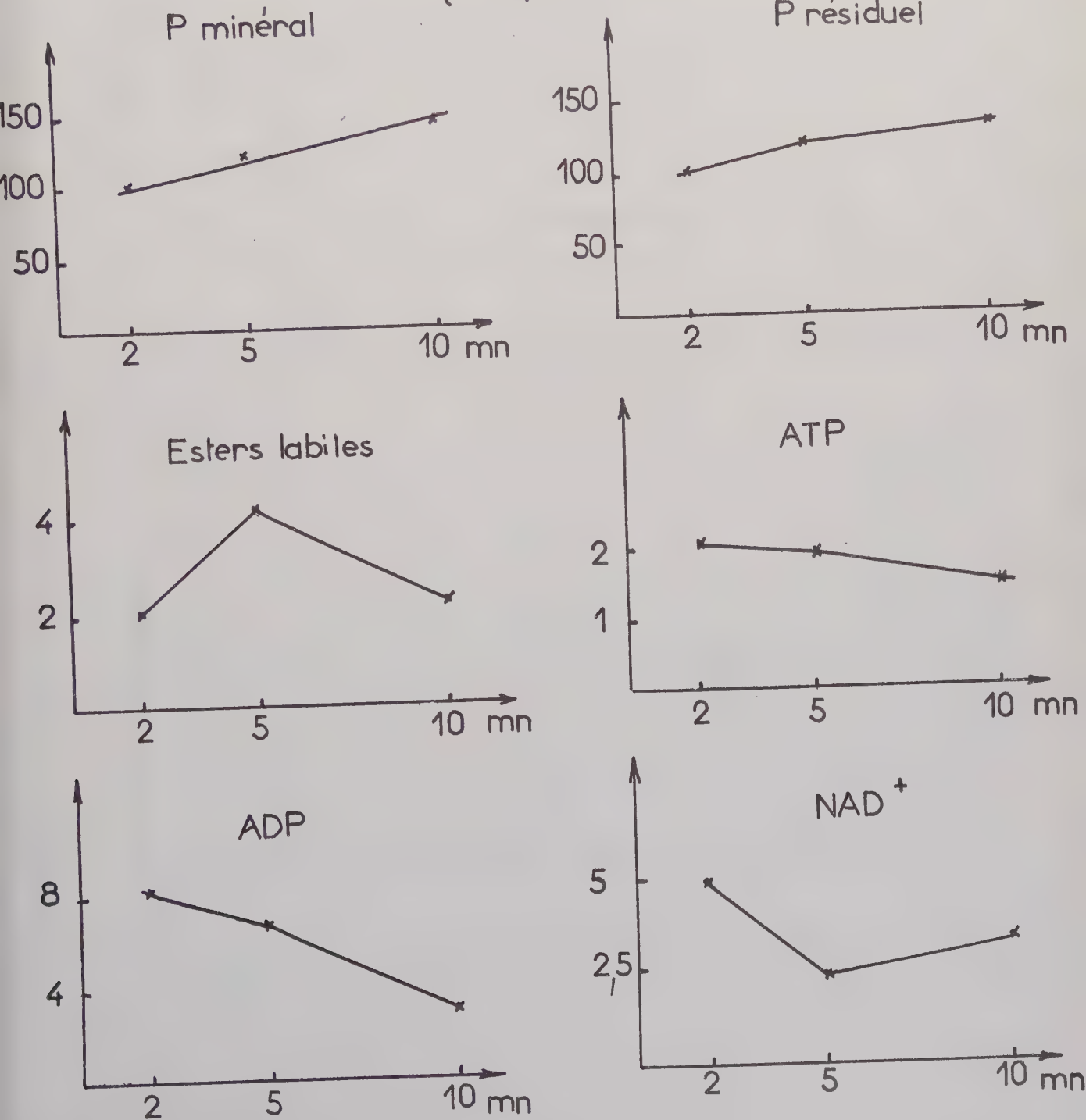
- Phosphate intra-cellulaire. Le régime athérogène ralentit significativement le marquage du phosphate intra-cellulaire.

FIGURE 15

Evolution des fractions phosphorylées et des nucléotides adényliques de l'aorte athéromateuse en fonction du temps d'incubation

Milieu Krebs Bicarbonate Na⁺ (4 essais)

($\mu\text{gP/gpf.}$)



Milieu Krebs Ringer bicarbonate de sodium

Temps	2 mn		5 mn		10 mn	
	Régime					
P intra-cellulaire (E)	0	+	0	+	0	+
	0,7	0,5	1,5	1,5	2,4	1,1
P minéral (E)	1,4	1,2	2,1	1,6	2,9	1,5
P total (E)	0,6	0,4	0,9	0,6	1,3	0,8
P résiduel (E)	1,1	1,2	1,6	1,4	2,1	1,8
P labile (E)	0,07	0,06	0,11	0,10	0,17	0,15
ATP ₂ (E).....	0,15	0,13	0,18	0,15	0,22	0,14
(I).....	3,9	3,1	4,2	2,6	4,3	2,7
ADP ₂ (E).....	0,16	0,04	0,11	0,06	0,17	0,09
(I).....	2,1	1,9	2,4	1,8	2,9	1,4
AMP	0	0	0	0	0	0
NAD (E).....	0	0	0,019	0,014	0,025	0,013
(I).....	0	0	0,27	0,18	0,29	0,16

Les valeurs moyennes (4 expériences) correspondent à la radio-activité spécifique exprimée en pourcentage par rapport à celle du Phosphate Intra (I) et Extra-cellulaire (E).

* Radioactivité spécifique du P terminal.

La signification des résultats est donnée dans le texte (p. 149 à 151).

Signification des différences observées
entre témoins et traités

2 mn	5 mn	10 mn
$P = 0,02$	$P < 0,01$	$P < 0,001$

- Phosphate minéral. Le régime diminue de façon significative le marquage du phosphate minéral aux différents temps d'incubation.

Signification

2 mn	5 mn	10 mn
$0,02 < P < 0,05$	$P < 0,01$	$P < 0,001$

- Phosphore total. On note le même effet qu'en ce qui concerne le phosphate minéral et intra-cellulaire.

Signification

2 mn	5 mn	10 mn
$P = 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$

- Phosphore résiduel. Le régime modifie peu la vitesse de marquage du phosphore des esters phosphoriques des glucides. La vitesse de marquage n'est diminuée de façon significative qu'après 10 minutes d'incubation.

Signification

2 mn	5 mn	10 mn
$P > 0,05$	$P = 0,05$	$P = 0,02$

- Phosphore labile. La même constatation s'impose : le régime ne modifie pas de façon sensible la vitesse de marquage du phosphore

labile.

Signification

2 mn	5 mn	10 mn
$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P = 0,05$

On constate de plus, chez les témoins comme chez les animaux soumis au régime athérougène, qu'après 10 minutes d'incubation le phosphate de la phosphocréatine n'est pas encore en équilibre avec le phosphate terminal de l'ATP.

- ATP. On a calculé la vitesse de marquage du phosphate γ terminal

Le régime diminue de façon significative la vitesse de renouvellement de l'ATP.

Signification

2 mn	5 mn	10 mn
$0,02 < P < 0,05$	$P = 0,01$	$P < 0,01$

- A DP. On a calculé la vitesse de marquage du phosphate β .

On observe un effet analogue : le régime diminue significativement la vitesse de renouvellement de l'ADP.

Signification

2 mn	5 mn	10 mn
$P = 0,02$	$P < 0,01$	$0,001 < P < 0,01$

- NAD. L'incorporation du phosphate radio-actif est très lente et ne débute qu'après deux minutes d'incubation, chez les témoins et chez les traités.

Là encore le régime diminue significativement la vitesse

de renouvellement de ce nucléotide.

Signification

2 mn	5 mn	10 mn
non marqué	$P = 0,01$	$P < 0,01$

- AMP. Chez les témoins comme chez les traités, le phosphate de l'AMP n'est jamais marqué, quelque soit le temps d'incubation.

L'administration d'un régime athérogène permet donc de mettre en évidence, après trois mois de traitement, une diminution significative de la vitesse de marquage des fractions phosphorylées ainsi que de la vitesse de renouvellement des nucléotides adényliques dans le tissu aortique.

Il est important de noter qu'il se produit en cours d'incubation, chez les témoins et chez les traités, une diffusion d'AMP et de NAD, du tissu aortique dans le milieu d'incubation.

Cependant une différence notable existe : chez les témoins le passage des nucléotides dans le milieu d'incubation n'apparaît qu'entre la cinquième et la dixième minute, alors que chez les traités, dès la deuxième minute, apparaissent dans le milieu d'incubation de l'AMP -(traces)- et surtout du NAD. Fait à souligner, le NAD n'est pas marqué.

4 - EFFETS DU REGIME ATHEROGENE SUR LE METABOLISME OXYDATIF DE L'AORTE

a) Teneurs en ADN et en ARN des tissus hépatique et aortique après trois mois de régime athérogène.

Etant donné la diminution significative du taux des nucléotides adényliques dans le tissu aortique et hépatique

chez les animaux soumis à un régime athérogène, il était intéressant de vérifier si cet abaissement du taux des nucléotides, particulièrement en ce qui concerne l'ATP, facteur limitant pour la synthèse d'ARN, pouvait avoir une incidence sur le taux des acides nucléiques dans ces deux tissus.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XXXVIII.

T A B L E A U XXXVIII

TENEURS COMPAREES EN ADN ET EN ARN DU TISSU AORTIQUE ET HEPATIQUE CHEZ LE LAPIN NORMAL ET SOUMIS A UN REGIME ATHEROGENE

TISSUS	ADN (Indol)		P	ARN		P
	TEMOINS	TRAITES		TEMOINS	TRAITES	
AORTE	0,07 ± 0,01	0,065 ± 0,03	P>0,05	0,11 ± 0,03	0,04 ± 0,03	P<0,01
FOIE	1,59 ± 0,19	1,38 ± 0,25	P>0,05	4,48 ± 0,36	3,56 ± 0,45	0,05<P<0,01

Les valeurs moyennes sont suivies de l'erreur-type.(10 cas).

Il ressort de l'examen du tableau XXXVIII que le taux d'ADN dans l'aorte et le foie, bien qu'abaissé, n'est pas modifié de façon significative chez les animaux traités. En revanche, le taux d'ARN est diminué significativement dans les deux tissus.

Cette diminution est surtout importante dans le tissu aortique puisque la valeur moyenne du taux d'ARN est abaissée de plus de 50 % après trois mois de régime.

Cette constatation trouve son corrolaire dans l'analyse de la teneur en ARN des aortes de bovidés jeune et âgés, faite par MANDEL (1) qui trouve une diminution effective du taux d'ARN dans les aortes de bovidés âgés.

b) Effets du régime athérogène sur la consommation d'oxygène du tissu aortique

Les résultats sont présentés dans le tableau XXXIX.

T A B L E A U XXXIX

VARIATIONS DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE (QO_2) DE COUPES D'AORTES,
SOUS L'INFLUENCE DU REGIME ATHEROGENE

REGIME	0	1 mois	2 mois	3 mois
Nombre de cas	101	109	131	99
$\bar{X} \pm sm$	0,78 ± 0,04	0,73 ± 0,05	0,68 ± 0,02	0,61 ± 0,03
Signification (test F)		—	+	++

Les valeurs de F sont calculées par rapport à la valeur normale (0,78).

On constate sous l'influence du régime athérogène, une diminution progressive de la consommation d'oxygène dans le tissu aortique. Cependant cette diminution ne devient significative qu'après deux mois de traitement. Après trois mois de régime cette diminution est de l'ordre de 29 % par rapport à la valeur moyenne chez les témoins.

Dans le tissu hépatique on observe également après trois mois de traitement une diminution significative de la consommation d'oxygène. La valeur moyenne de $\dot{Q}O_2$ qui est chez les témoins (27 cas) de $5,58 \pm 0,23$ tombe chez les traités (33 cas) à $3,32 \pm 0,09$, ce qui représente une diminution de l'ordre de 39 %.

Ce fait est confirmé par les travaux de MALYSHEVA (103) sur le taux de la respiration de certains organes au cours de l'athérosclérose expérimentale chez le lapin. Cet auteur note en effet une diminution de 36,8 % de la consommation d'oxygène dans le tissu hépatique sous l'influence du régime hypercholestérolé.

En ce qui concerne le tissu aortique nos résultats sont en accord avec ceux de FISCHER et GELLER (104) de WOLLEMAN et KOCSAR (59) et de MANDEL et coll. (105). En revanche CHATTOPADHYAY (106) observe peu de modifications de l'activité respiratoire au niveau de coupes de tissu artériel chez l'animal présentant une athérosclérose.

Il est intéressant de noter qu'une diminution de la consommation d'oxygène dans l'aorte, sous l'influence d'un régime athérogène, est rapportée par MUNRO et coll. (107) chez le jeune coq. En revanche ces auteurs notent au contraire une stimulation de la respiration de l'aorte chez le rat soumis à un régime riche en cholestérol.

c) Effets du régime athérogène sur le taux d'oxydation du pyruvate et du succinate : rapports P/O

Les résultats sont présentés dans le tableau XXXX.

T A B L E A U XXXX

VARIATIONS DU RAPPORT P/O CHEZ LE LAPIN SOUMIS A UN REGIME
ATHEROGENE (3 mois)

ORGANES	Nbre de cas	SUBSTRATS	RAPPORT P/O		P
			TEMoins	TRAITES	
AORTE	14	PYRUVATE	1,8 ± 0,2	0,9 ± 0,4	P < 0,01
	10	SUCCINATE	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,3	P > 0,05
FOIE	14	PYRUVATE	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,2	P = 0,01
	8	SUCCINATE	1,5 ± 0,3	1,2 ± 0,3	P > 0,05

Les valeurs moyennes sont suivies de l'erreur-type.

L'étude des résultats met en évidence une diminution significative du taux d'oxydation du pyruvate dans l'aorte chez les animaux soumis à un régime athérogène.

En revanche le taux d'oxydation du succinate n'est pas modifié de façon significative.

La même constatation est faite pour le foie, au niveau duquel le rapport P/O, en présence de pyruvate, est abaissé significativement chez les traités, alors qu'en présence de succinate, il ne l'est pas.

De l'ensemble des résultats obtenus il ressort que l'administration prolongée de cholestérol, conduit d'une part à un abaissement progressif de la respiration tissulaire (Cf. tableau XXXIX) ainsi qu'à une diminution des phosphorylations oxydatives, liées au pyruvate, dans les deux tissus aortique et hépatique.

En revanche ces tissus semblent conserver leur capacité d'oxyder le succinate, après un traitement athérogène.

RESUME - CONCLUSIONS

Le travail que nous venons d'exposer nous a permis de mettre en évidence les faits nouveaux suivants :

1) Métabolisme de l'aorte

L'AORTE SYNTHETISE LES PROTEINES DE FAÇON MOINS ACTIVE QUE LE FOIE.

Cette conclusion s'appuie d'une part sur l'isolement et la préparation, effectués pour la première fois à partir de l'aorte des deux fractions sub-cellulaires indispensables - la fraction particulaire microsomale et les enzymes d'activation de la fraction cytoplasmique soluble - et d'autre part sur l'incorporation d'acides aminés marqués dans les protéines microsomales en présence de sur-nageant à 105.000 g ou du système enzyme pH 5 (enzymes d'activation et ARNt) obtenus à partir d'homogénats de tissu aortique et de tissu hépatique (Tableau VI). Ces faits sont également corroborés par les expériences d'incorporation de ^{14}C proline dans le collagène du tissu aortique (Tableau IX).

CE MECANISME DE BIOSYNTHESE EXIGE LA PRESENCE D'ATP, D'UN SYSTEME REGENERATEUR D'ENERGIE ET DE GTP.

Ces cofacteurs permettent d'obtenir une activité incorporatrice maximum (Tableau IV). Leur importance et celle des fractions sub-cellulaires pour l'incorporation des acides aminés au niveau des ribosomes est soulignée par l'étude systématique du transfert

de ^{14}C leucine dans les protéines ribosomales du foie (Tableau VII), tissu choisi comme système de référence.

LE GLUTATHION REDUIT STIMULE DE FACON SIGNIFICATIVE LE TRANSFERT DES ACIDES AMINES DANS LES PROTEINES DU TISSU AORTIQUE.

Cette conclusion est étayée par les résultats concernant l'incorporation de ^{14}C leucine dans les protéines microsomales de l'aorte en présence de glutathion (Tableau II). Cet effet de stimulation du glutathion, lié à la présence de son groupement thiol, n'avait été jusqu'alors mis en évidence qu'au niveau du tissu hépatique.

LES RIBOSOMES DE L'AORTE FORMENT UN SYSTEME MOINS ACTIF QUE CEUX DU FOIE VIS A VIS DE L'INCORPORATION DES ACIDES AMINES.

Cette constatation s'appuie d'une part sur la comparaison des résultats d'incubations d'acides aminés marqués, en présence de surnageants à 5.000 g, obtenus à partir d'homogénats d'aorte et de foie (Tableaux IV et V) et d'autre part sur les données expérimentales fournies par l'incubation des microsomes d'aortes et de foie en présence de surnageant à 105.000 g et d'enzyme pH 5 (Tableau VI).

LES SYSTEMES MIXTES, MICROSOMES AORTIQUES ET SURNAGEANT DE FOIE, OU L'INVERSE, (INCUBATIONS CROISEES, Tableau VII) SONT CAPABLES D'INCORPORER LES ACIDES AMINES COMME LES SYSTEMES PROVENANT D'UNE SEULE SOURCE.

LES PROTEINES SERIQUES FILTRENT NORMALEMENT A TRAVERS LA PAROI AORTIQUE ET SE FIXENT AU NIVEAU DE CE TISSU. Cette donnée est confirmée par les résultats d'électrophorèse et d'immunoélectrophorèse (Tableau X, figures 3 à 5).

LA DISPONIBILITE DU TISSU AORTIQUE EN NUCLEOTIDES ADENYLIQUES EST FAIBLE.

Cette conclusion est corroborée par l'étude comparative de la répartition et du taux des nucléotides libres dans les deux tissus hépatique et aortique. La teneur en nucléotides adényliques est en moyenne de 6 à 10 fois plus élevée dans le tissu hépatique (Tableaux XII et XIV). L'AMP existe en quantité importante dans le foie alors qu'il n'est retrouvé qu'à l'état de traces dans l'aorte.

LA TENEUR EN ACIDES NUCLEIQUES DE L'AORTE EST DE 20 A 40 FOIS MOINS IMPORTANTE QUE CELLE DU FOIE.

LE TAUX DE LA RESPIRATION ENDOGENE DE L'AORTE EST FAIBLE COMPAREE A CELLE DU FOIE.

L'addition de glucose ne stimule pas le taux de la respiration endogène de coupes de tissu aortique. De plus les taux d'oxydation du lactate, de l' α -cétooglutarate et de l'acétoacétate sont supérieurs à celui du glucose (Tableau XVI). L'aorte oxyde le succinate à un taux supérieur à celui de tous les autres substrats.

LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE EST UNE DES CARACTERISTIQUES DU METABOLISME OXYDATIF DE L'AORTE.

L'activité oxydo-phosphorylante des homogénats d'aorte est très importante comparée à celle d'homogénats de foie (Tableau XVII).

2) Influence de l'adrénaline

L'ADRENALINE PROVOQUE UNE DIMINUTION SIGNIFICATIVE DU TAUX DES FRACTIONS PHOSPHORYLEES ET DES NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DE L'AORTE.

Cette conclusion est étayée par les résultats obtenus en injectant l'adrénaline par voie intra-veineuse (Tableau XVIII, figure 6). L'étude de la cinétique d'évolution des fractions

phosphorylées met en évidence deux effets : l'augmentation du taux de phosphate minéral et la diminution plus ou moins marquée du taux de toutes les autres fractions phosphorylées (Tableau XVIII). Des injections quotidiennes d'adrénaline pendant un mois provoquent des effets analogues (Tableau XIX), de même que l'injection de faibles doses (Tableau XX). La diminution du taux des nucléotides adényliques s'accompagne parallèlement d'une inhibition marquée du taux de la respiration tissulaire.

L'ADRENALINE, INJECTEE PAR VOIE INTRA-VEINEUSE, PROVOQUE UNE AUGMENTATION SIGNIFICATIVE DE LA VALEUR DE L'ESPACE EXTRA-CELLULAIRE DE L'AORTE, MESUREE IN VIVO OU IN VITRO.

Ces résultats ont été acquis en utilisant comme traceur le phosphate radio-actif (figure 9) et l'inuline (Tableau XXIII).

LES INJECTIONS D'ADRENALINE AUGMENTENT LA VITESSE D'INCORPORATION DU ^{32}P DANS LES NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DE L'AORTE.

La vitesse de marquage (figures 12 et 13) est très différente. Le phosphate terminal de l'ATP se marque beaucoup plus vite que le phosphate β de l'ADP, tandis que l'AMP n'est jamais marqué. L'incorporation du ^{32}P dans le NAD est plus lente que dans l'ADP et l'ATP mais elle est également stimulée par l'adrénaline.

L'ADRENALINE MODIFIE LA VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES FRACTIONS PHOSPHORYLEES DE L'AORTE.

Quelque soit le milieu d'incubation, l'adrénaline ralentit de façon significative le marquage du phosphate intra-cellulaire et du phosphate minéral (Tableau XXIV). En revanche elle augmente significativement la vitesse de renouvellement des autres fractions phosphorylées (phosphore total, résiduel, labile) ainsi que de l'ATP, l'ADP et du NAD. (Tableau XXIV).

3) Effets du régime athérogène

Les principaux effets provoqués par le régime hypercholestérolé au niveau de l'aorte sont les suivants :

IL ENTRAINE UNE DIMINUTION SIGNIFICATIVE DU TAUX D'INCORPORATION DES ACIDES AMINES DANS LES PROTEINES DE L'AORTE.

Après trois mois de régime, on observe une diminution significative du transfert de la ^{14}C leucine dans les protéines (Tableau XXV) ainsi que de l'incorporation de ^{14}C proline dans le collagène insoluble au bout d'un mois de traitement (Tableau XXVII).

IL PROVOQUE UNE DIMINUTION SIGNIFICATIVE DU TAUX DES FRACTIONS PHOSPHORYLEES DE L'AORTE.

Dès le premier mois de traitement ces fractions baissent régulièrement. Après trois mois et demi, la diminution est de l'ordre de 50 % pour les fractions phosphorylées (Tableau XXVIII) et atteint en moyenne 70 % pour les nucléotides adényliques (Tableau XXIX).

L'adrénaline provoque chez les animaux traités des effets encore plus marqués que chez les témoins (Tableau XXXI, figure 14).

IL RALENTIT DE FAÇON SIGNIFICATIVE LA VITESSE DE RENOUELEMENT DES COMPOSES PHOSPHORYLES DE L'AORTE.

A l'exception du phosphore résiduel et labile, dont la vitesse de marquage n'est pas modifiée de façon sensible, le traitement provoque une diminution de la vitesse de marquage des autres fractions phosphorylées ainsi que de la vitesse de renouvellement de l'ATP, de l'ADP et du NAD (Tableau XXXVII).

IL ENTRAINE UNE DIMINUTION SIGNIFICATIVE DU TAUX D'ARN DE L'AORTE.

Si le taux d'ADN, bien qu'abaissé, n'est pas modifié de façon significative, en revanche le taux d'ARN est diminué de plus de 50 % après trois mois de régime (Tableau XXXVIII).

IL ABAISSE LE METABOLISME OXYDATIF DE L'AORTE.

La consommation d'oxygène diminue progressivement dans le temps. Après trois mois de régime, cette diminution est de l'ordre de 29 % par rapport à la valeur normale (Tableau XXXIX). L'oxydation du pyruvate par des homogénats d'aorte est diminuée de façon significative (rapport P/O) ; en revanche le taux d'oxydation du succinate ne semble pas modifié (Tableau XXXX).

DISCUSSION

Les résultats et conclusions précédents appellent un certain nombre de commentaires que nous développerons en trois points. Nous envisagerons en premier lieu le métabolisme de l'aorte en essayant de le situer par rapport à d'autres tissus puis nous étudierons successivement l'influence de l'adrénaline et du régime athérogène sur le métabolisme aortique.

1) METABOLISME DE L'AORTE.

Avant d'aborder la discussion de nos résultats, il est important de rappeler que l'aorte est un tissu artériel pauvre en cellules. La seule partie métaboliquement active de ce tissu est représentée par l'ensemble des deux tuniques interne et moyenne : l'intima, constituée de cellules endothéliales et la média, faite d'assises fibrillaires musculaires et surtout élastiques. La tunique externe ou adventice étant représentée essentiellement par du tissu conjonctif de soutien. La deuxième particularité histologique de l'aorte, qui se nourrit par imbibition, réside dans l'absence totale, chez le Lapin du moins, des petits vaisseaux intra-pariétaux (vasa vasorum), habituellement présents dans les artères de gros calibres, qui apportent au sein même du tissu artériel les matériaux nutritifs indispensables. Le fait que la nutrition de l'intima et de la média des artères se fassent par imbibition représente un avantage pour les études métaboliques in vitro et pour l'étude de l'action des hormones. En effet, les expériences in vitro effectuées sur le tissu artériel reflètent de façon beaucoup plus proche de la réalité ce qui se passe dans le tissu ; ce qui n'est pas toujours le cas pour d'autres tissus

ou organes. Les conclusions qui découlent de telles expériences peuvent être plus facilement extrapolées aux phénomènes in vivo. Ces particularités de la structure histologique de l'aorte expliquent que nous n'ayons utilisé, pour l'ensemble de notre expérimentation, que l'ensemble intima plus média, disséquant systématiquement la graisse externe et le conjonctif de l'adventice.

a) Biosynthèse des protéines

L'aorte est capable, comme n'importe quel tissu, de synthétiser les protéines indispensables aussi bien au maintien de son activité métabolique qu'à l'intégrité de sa structure. Toutefois ce processus de synthèse est beaucoup moins actif comparé à d'autres tissus. Ceci s'explique d'abord par la structure histologique particulière de l'aorte et les résultats obtenus parallèlement à partir du tissu aortique et hépatique que nous avons choisi comme tissu de référence. La réalité de cette biosynthèse a été démontrée par l'isolement et la préparation à partir de l'aorte des fractions sub-cellulaires impliqués dans ce mécanisme : les microsomes (ribosomes ou particules ribonucléoprotéiques fixés sur les membranes du reticulum endoplasmique) ainsi que les enzymes d'activation et les ARN de transfert (fraction enzyme pH 5) contenus dans la partie soluble du cytoplasme. L'isolement de ces fractions, que nous avons été le premier à réaliser à partir de l'aorte, nous a permis d'étudier l'incorporation d'acides aminés radio-actifs dans les protéines de l'intima et de la média de la paroi aortique du Lapin. Les résultats acquis (Tableaux III, IV et VI) témoignent de l'incorporation effective de la leucine, de la proline et du glyco-colle marqués dans les protéines ribosomales de l'aorte. Cette incorporation est nulle si l'on omet d'ajouter les microsomes dans le milieu d'incubation (Tableau VIII) ou si l'on fait bouillir au préalable la suspension microsomale. Il en est de même en ce qui concerne la fraction cytoplasmique soluble. L'Adénosine triphosphate (ATP), la Guanosine triphosphate (GTP)

et un système générateur d'énergie (phospho-énol pyruvate et pyruvate Kinase) sont indispensables pour réunir l'activité incorporatrice maximum dans les deux tissus aortique et hépatique (Tableaux IV et V). L'importance de ces cofacteurs est soulignée par l'étude de l'incorporation de leucine marquée dans les protéines ribosomales du foie (Tableau VIII). On note en effet qu'en l'absence d'ATP, d'un système générateur d'énergie ou de GTP, le taux d'incorporation est diminué des trois quarts par rapport à la valeur normale obtenue avec le milieu d'incubation complet. Il existe également dans l'aorte une synthèse des protéines de structure comme en rend compte l'incorporation de proline marquée dans le collagène insoluble (Tableau IX). Ces résultats, acquis en 1961, date à laquelle on ne possédait pas encore de données extrêmement précises sur le processus des synthèses protéiques, s'expliquent parfaitement maintenant que le mécanisme général de biosynthèse des protéines est bien connu. Ils prouvent cependant, au niveau de l'aorte, l'importance de la glycolyse permettant la régénération d'ATP, grâce au système phospho-énol pyruvate - pyruvate Kinase, et démontrent que l'activation des acides aminés est sensible au niveau d'ATP comme dans les autres tissus.

Un point particulier doit être évoqué concernant l'effet de stimulation du glutathion réduit (GSH) sur le transfert des acides aminés dans les protéines ribosomales. Cet effet favorable du GSH a été observé par certains auteurs (67, 68, 108) au niveau du foie. Nous l'avons mis en évidence au niveau du transfert des acides aminés dans les protéines aortiques (Tableau II). En l'absence de glutathion, l'activité enzymatique est plus faible ; de plus si celui-ci est ajouté au temps zéro, le taux de transfert augmente avec le temps. On observe les mêmes résultats avec le tissu hépatique (Tableau II). Des résultats similaires sont obtenus avec d'autres composés sulfhydriles, tels que la cystéamine, le mercapto-éthanol ou la mercapto-éthylamine. Nos résultats sont en accord avec ceux de BISHOP et de SCHWEET (108) qui ont pu

déterminer que les composés thiols ne participent pas directement à la réaction de transfert mais agissent comme activateurs d'enzymes. Nous avons personnellement observé cet effet protecteur du glutathion et du mercapto-éthanol sur des enzymes d'activation préparées à partir du foie et conservées plusieurs semaines à - 20° en présence de l'un ou l'autre de ces composés, sans qu'ils perdent leur activité alors que des préparations analogues effectuées sans addition de ces composés perdent rapidement leur capacité d'incorporer les acides aminés.

La biosynthèse des protéines est moins active dans l'aorte que dans le foie, comme le font ressortir les résultats concernant l'incubation d'acides aminés marqués en présence de microsomes et de surnageants à 5.000 g et à 105.000 g obtenus à partir d'homogénats aortiques et hépatiques (Tableaux IV à VI). Cette différence d'activité s'explique en premier lieu par les taux respectifs d'acides nucléiques, témoins de l'activité métabolique de ces deux tissus. L'aorte contient, en effet, rapporté au poids sec environ 20 fois moins d'ADN que le foie (0,08 % contre 1,63%) et 40 fois moins d'ARN (0,11 % contre 4,48 %). Ce fait peut être en relation avec la faible disponibilité de l'aorte en nucléotides libres et notamment en ATP. Or celui-ci est impliqué à la fois dans l'activation des acides aminés et dans les transphosphorylations conduisant à la production des nucléosides triphosphates qui participent avec l'ATP à la synthèse des ARN indispensables aux synthèses protéiques. En second lieu cette différence dans l'activation des acides aminés est attribuable aux propriétés des fractions microsomales de l'aorte et du foie. Le taux d'incorporation dans les microsomes d'aorte (Tableau VI) est environ le tiers de celui des microsomes de foie. De plus, les expériences d'incubations croisées rapportées dans le tableau VII (microsomes d'aorte et surnageant à 105.000 g de foie ou l'inverse), réalisées avec la leucine marquée, nous permettent de confirmer que les microsomes de l'aorte forment un système incontestablement moins actif que ceux du foie.

Cependant, il est intéressant de noter que le taux d'incorporation de la leucine dans les microsomes du foie est plus faible en présence de surnageant à 105.000 g d'aorte qu'avec le surnageant de foie ce qui semblerait indiquer que la différence d'activation des acides aminés au niveau de l'aorte relève aussi en partie d'une moindre activité de la fraction cytoplasmique soluble. Ces expériences d'incubations croisées nous permettent d'apporter un fait expérimental qui n'avait été mis en évidence que par FLORINI (109) en 1962, pour les muscles du squelette chez le Rat, à savoir que les systèmes mixtes microsomes aortiques et surnageant de foie, ou l'inverse, sont capables d'incorporer les acides aminés comme les systèmes provenant d'une seule source. Ces expériences démontrent le caractère non spécifique des ribosomes et des enzymes d'activation de l'aorte.

b) Métabolisme énergétique

Nos recherches ont porté sur l'analyse de la répartition des fractions phosphorylées, sur la consommation d'oxygène en présence de différents substrats et sur la capacité d'oxydation phosphorylative de l'aorte. Le taux des nucléotides adényliques, riches en énergie, est faible dans le tissu aortique. Cependant, les teneurs en ATP et en ADP (14,7 et 24,6 μ moles/100 g PF) sont plus élevées que celles déterminées par d'autres auteurs chez d'autres animaux. MANDEL notamment (1) a trouvé dans l'aorte de Lapin, un taux d'ATP 11 fois plus faible, qu'il attribue à une hydrolyse spontanée durant le délai entre le sacrifice de l'animal et l'obtention de l'extrait acido-soluble. Plusieurs faits militent en faveur de notre technique, d'une part le délai très court (6 à 10 minutes maximum) qui sépare le sacrifice de l'animal et l'obtention de l'extrait acido-soluble, et d'autre part l'absence d'AMP (traces à peine visibles sur les chromatogrammes). Ces faits sont très en faveur de notre méthode de dissection et de dosage et permettent de penser qu'il n'y a pas d'hydrolyse au cours des techniques et que les valeurs obtenues sont très proches des

valeurs réelles dans le tissu vivant. Nos valeurs d'ATP ont d'ailleurs été contrôlées par la méthode enzymatique basée sur la luminescence d'extraits d'organes de *Photynus Pyralis* et sont parfaitement concordantes. Enfin l'absence d'AMP permet de penser qu'il n'y a pas d'activité myokinase dans les extraits. Les valeurs des nucléotides adényliques sont très proches chez les animaux de race commune et chez les Albinos, mais sont un peu plus élevées chez les animaux consanguins. On remarque également la haute teneur en NAD et en ADP par rapport à l'ATP. Le rapport ATP/ADP est faible et voisin de 0,6 chez les trois types d'animaux examinés. En ce qui concerne les fractions phosphorylées on relève une quantité appréciable d'esters phosphorylés très labiles et d'esters phosphorylés des glucides (phosphore résiduel) (Tableau XI).

Il est intéressant de comparer la teneur en nucléotides libres du tissu aortique à celle du foie, du myocarde et du cerveau, déterminée parallèlement chez le Lapin. Nous limiterons cette comparaison aux nucléotides adényliques qui ont un rôle important dans le métabolisme énergétique. Le taux des nucléotides adényliques (Tableaux XII et XIV), est très faible dans l'aorte et représente environ le dixième de ce que l'on trouve dans le foie. La différence la plus frappante porte sur le taux d'AMP qui existe en quantité importante dans le foie ($178 \mu\text{M}/100 \text{ g PF}$) alors qu'il n'est retrouvé qu'à l'état de traces dans l'aorte. La teneur en nucléotides adényliques du muscle cardiaque (14 expériences) fait ressortir également cette différence puisque les taux (en $\mu\text{M}/100 \text{ g PF}$) d'ATP (152 ± 3), d'ADP (148 ± 5) et de NAD ($40 \pm 1,4$) sont de 4 à 10 fois plus élevés que dans l'aorte ; l'AMP (143 ± 7) est présent en quantité importante. En ce qui concerne le tissu cérébral (14 expériences), la différence, encore importante, est moins marquée que pour le myocarde. Les taux d'ATP ($92 \pm 1,7$) et de NAD (34 ± 1) sont de 3 à 6 fois plus élevés. Le taux d'AMP (84 ± 4) est également important. Seul le taux d'ADP ($36,7 \pm 1,8$) est proche de celui de l'aorte ($24,6 \pm 1,6$).

Cette différence importante dans la teneur en nucléotides riches en énergie indique de façon formelle que le capital énergétique du tissu aortique est très restreint par rapport à des tissus comme le foie, le myocarde ou le cerveau. Cette étude comparative permet de penser que le taux des nucléotides libres peut être considéré comme un indice très valable du niveau métabolique d'un tissu. Cette notion présente un grand intérêt lorsqu'on étudie les effets d'un régime athérogène sur le métabolisme énergétique de l'aorte. D'autre part, le fait que l'aorte contienne de 20 à 40 fois moins d'acides nucléiques que le foie (Tableau XV) est parfaitement compatible avec sa structure histologique, pauvre en cellules, et s'accorde également avec sa faible teneur en nucléotides libres, directement impliqués dans la synthèse des ARN et de l'ADN.

Ces données sont confirmées par l'étude de la consommation d'oxygène et la mesure des rapports P/O. En effet, la respiration endogène de l'aorte est faible (Tableau XVI) et n'est pas stimulée par un certain nombre de substrats. La valeur moyenne de QO_2 (0,72) est en accord avec celles données dans la littérature concernant le tissu aortique, chez d'autres espèces animales. La respiration endogène mesurée en présence du seul tampon phosphate sans addition de substrats, n'est pas stimulée de façon significative par l'addition de glucose. Cette donnée est en accord avec les observations de CHATTOPADHYAY (90). Ceci peut être dû au fait que le glucose est présent en quantité suffisante dans l'aorte comme en témoigne l'importante activité glycolytique de ce tissu. La part de la glycolyse anaérobie dans la dégradation du glucose est en effet, d'après MANDEL (1), de 80 % chez le Lapin. Le cinquième seulement du glucose présent dans le tissu aortique est donc utilisé par la voie oxydative, ce qui indique que le rendement énergétique de la dégradation du glucose par l'aorte est extrêmement faible. Ce mauvais rendement énergétique dans l'aorte, lié à la primauté de la voie glycolytique permet d'expliquer la faible teneur en ATP et le taux appréciable de NAD dans

ce tissu. Ce rendement est très inférieur à celui d'autres tissus puisque le foie ou le muscle utilisent environ 70 % du glucose par voie oxydative contre 20 % seulement dans la paroi artérielle (1). De même l'addition de lactate, d'alpha-cétoglutarate et d'acétoacétate ne stimulent pas la respiration endogène. En ce qui concerne ces deux substrats, nos résultats sont en accord avec ceux de DISABATO et COMOLLI (87).

Le succinate au contraire occupe une place particulière puisqu'il est le seul substrat qui stimule significativement le taux de la respiration. Ce fait a été rapporté chez de nombreuses espèces animales (87, 95, 96). Chez le Lapin, nos résultats sont corroborés par ceux de CHATTOPADHYAY (90) qui indiquent que le taux d'oxydation du succinate est quatre fois supérieur à celui des autres substrats. Nos résultats personnels font état d'un taux d'oxydation deux fois supérieur. Cette discordance apparente s'explique par le fait que nous avons mesuré la consommation d'oxygène sur l'aorte totale et non pas comme l'a fait cet auteur sur l'aorte thoracique et abdominale prises séparément. Or les observations de certains auteurs (89, 90) montrent qu'il existe un gradient d'activité décroissante de la succino-déshydrogénase dans le tissu aortique depuis la crosse jusqu'à la partie abdominale. CHATTOPADHYAY (90) rapporte également cette plus grande activité de la succino-déshydrogénase au niveau de la crosse et de la partie ascendante de l'aorte. De fait nous avons nous-mêmes observé au cours des mesures de QO_2 effectuées sur différents segments aortiques que la crosse et la partie thoracique supérieure de l'aorte respirent mieux que la partie thoracique inférieure ou abdominale. DISABATO et COMOLLI (87), mesurant l'oxydation du succinate sur l'aorte totale, rapportent comme nous l'avons fait, la consommation d'oxygène à la teneur en ADN. Ils trouvent une valeur comparable à celle que nous avons obtenue. La consommation d'oxygène de coupes de tissu aortique en présence de succinate

peut être considérée comme un bon indice de l'activité de la succino-déshydrogénase et de la cytochrome oxydase, par rapport aux autres enzymes oxydatifs. Cette conclusion est étayée par le fait que le rapport P/O mesuré avec le succinate est meilleur qu'avec d'autres substrats, ce qui témoigne d'un bon couplage.

Bien que la glycolyse tienne une place importante dans le métabolisme énergétique de l'aorte, on constate que cette artère possède une activité oxydo-phosphorylante non négligeable comme l'attestent les rapports P/O mesurés en présence du couple pyruvate-malate et du succinate (Tableau XVII). Seuls des rapports P/O mesurés avec des mitochondries permettraient de déterminer le rendement maximum eu égard aux valeurs théoriques, néanmoins ces faits prouvent que l'aorte est capable, comme n'importe quel tissu, d'oxyder les substrats du cycle de KREBS. Les valeurs de P/O mesurées dans l'aorte sont extrêmement voisines de celles obtenues dans le foie. Les données acquises avec le succinate semblent prouver que la succino-déshydrogénase est l'enzyme le plus actif dans les mitochondries du tissu aortique. Il faut souligner en effet l'excellent couplage obtenu en présence de succinate (rapport P/O 1,4) par opposition au faible taux d'oxydation du pyruvate (rapport P/O 1,8).

2) INFLUENCE DE L'ADRENALINE.

Etant donné les effets de l'adrénaline sur la paroi artérielle, il nous a paru intéressant d'étudier l'incidence de l'hypoxie, liée à la vaso-constriction artérielle provoquée par cette hormone, sur le métabolisme énergétique de l'aorte. Nos recherches ont porté essentiellement sur l'évolution du taux des nucléotides adényliques et la variation de la consommation d'oxygène dans le tissu aortique, sous l'influence de l'adrénaline.

L'injection d'adrénaline par voie intra-veineuse, chez le Lapin, (Tableau XVIII et figure 6) montre que l'action de cette

hormone sur l'aorte se caractérise par une diminution importante des composés phosphorylés riches en énergie et par une accumulation de phosphate minéral. Nos résultats sont corroborés par ceux de GAUTHERON et CLAUSER (97, 98) qui ont démontré, chez le Rat, que des injections intra-péritonéales d'adrénaline inhibent le métabolisme aérobie et anaérobie du muscle utérin et du diaphragme et diminuent le taux des dérivés phosphorylés riches en énergie. Les nucléotides adényliques sont plus touchés que les phosphates labile et résiduel. Ces effets sont analogues à ceux observés dans le muscle lisse et strié (99, 110), mais ils sont beaucoup plus rapides. Ceci est très probablement en relation d'une part avec le mode d'administration de l'adrénaline, injectée par voie intra-veineuse et non en intra-péritonéale comme précédemment, et d'autre part avec le fait que le phénomène est beaucoup plus rapide étant donné que l'artère se nourrit par imbibition. Dans le cas d'injections uniques d'une faible dose d'adrénaline (4,6 μ g au lieu de 46 μ g) les effets sont plus lents à se manifester sauf en ce qui concerne le phosphate minéral qui augmente dès la première minute après l'injection (Tableau XX). Après un traitement prolongé à l'adrénaline toutes les fractions phosphorylées sont notablement diminuées sauf le NAD et le phosphore résiduel (Tableau XIX). Les fractions les plus affectées sont l'ATP et l'ADP, sans qu'il y ait accumulation d'AMP, de 3', 5' - AMP cyclique ou de produits de dégradation du noyau adénylique. Il faut souligner que l'adrénaline affecte peu le taux du NAD et surtout des esters phosphoriques des glucides (P résiduel) qui tend même à augmenter légèrement. Ce fait est en relation avec l'augmentation notable du taux de la glycolyse observée par MANDEL (1) dans la paroi aortique sous l'effet de l'adrénaline, ce qui indique une réduction du rendement énergétique. D'autre part au cours de l'administration de l'adrénaline il se produit un phénomène d'adaptation à l'hypoxie, créée par cette hormone, qui se traduit par une augmentation de l'activité lactico-déshydrogénasique (1).

MATRAY et GAUTHERON (111) ont au contraire observé, chez le Rat, une inhibition de la glycolyse dans l'utérus après injection d'adrénaline. L'absence d'accumulation des produits de dégradation du noyau adénylique signifie que si ces dérivés se forment, ils doivent rapidement passer dans le courant sanguin. Au contraire il est curieux de constater que le phosphate minéral s'accumule dans le tissu aortique et par conséquent est retenu. Comme le taux global des nucléotides adényliques diminue sensiblement, sous l'effet de l'adrénaline, il y a donc une perte du noyau adénylique de l'aorte, et la régénération de l'ATP et de l'ADP doit passer par une synthèse "de novo". L'ensemble de ces résultats permet de penser que l'adrénaline a une action univoque au niveau de tissus aussi différents que l'utérus, le diaphragme et l'aorte, au moins en ce qui concerne son effet sur les composés phosphorylés dans ces tissus. D'autre part l'évolution du taux des nucléotides adényliques est parallèle à celle de l'intensité de la respiration de l'aorte. Cette inhibition de la respiration sous l'influence de l'adrénaline est de l'ordre de 20 % entre les dixièmes et vingtièmes minutes qui suivent l'injection, ce qui correspond précisément à l'abaissement maximum des taux d'ATP et d'ADP. On peut donc penser que c'est la diminution de ces nucléotides qui est responsable de l'inhibition de la respiration, dont on sait depuis CHANCE et HESS (112) qu'elle est contrôlée par les taux d'ADP et d'ATP disponibles. Sous réserve cependant que cette diminution ne soit pas compensée par une augmentation de la vitesse de renouvellement de ces nucléotides.

La mesure de la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés sous l'influence de l'adrénaline impliquait de déterminer de la façon la plus rigoureuse possible la valeur de l'espace liquidien extra-cellulaire de l'aorte pour pouvoir connaître avec précision la concentration intra-cellulaire du phosphate minéral, précurseur des nucléotides. Les résultats acquis, en utilisant comme traceur, l'inuline, le thiocyanate et le phosphate

marqué (Tableau XXI) nous montrent que la valeur de l'espace extra-cellulaire (E.E.C.) varie en fonction de la topographie aortique (Tableau XXII). Nous avons par conséquent effectué notre expérimentation uniquement sur l'aorte thoracique, en éliminant le segment abdominal. L'adrénaline entraîne une augmentation significative de la valeur de l'E.E.C. in vitro (Tableau XXIII) et in vivo. Ce fait est en accord avec les observations de GAUTHERON et MORELIS dans le diaphragme de Rat (102).

Il faut noter que le fait d'incuber l'aorte modifie le taux des différentes fractions phosphorylées (figures 10 et 11). En milieu sérum, la teneur des nucléotides adényliques est sensiblement abaissée surtout en ce qui concerne le NAD. En milieu KREBS, bicarbonate de sodium, le taux de NAD est notablement diminué tandis que les taux d'ATP et d'ADP sont peu modifiés. En revanche le taux de phosphate minéral de l'aorte augmente de façon marquée dans les deux milieux par rapport à celui du tissu non incubé. Le taux d'ATP, d'ADP, des esters labiles et du phosphate résiduel est plus élevé en milieu sérum, tandis que celui du NAD est plus élevé en milieu bicarbonate. Au cours de l'incubation on constate que le taux de phosphate minéral augmente linéairement chez les témoins et diminue linéairement chez les traités dans les deux milieux. Ce qui implique qu'il y a une entrée de phosphate minéral dans les aortes témoins et que celui-ci est expulsé dans les aortes soumises à l'action de l'adrénaline. Chez les traités, le taux d'ATP diminue toujours au cours de l'incubation, quel que soit le milieu ; le taux d'ADP augmente légèrement en milieu sérum alors qu'il diminue en milieu bicarbonate ; le taux de NAD est peu modifié en milieu sérum tandis qu'il augmente en milieu bicarbonate. Etant donné qu'il n'y a pas d'accumulation d'AMP la somme des nucléotides adényliques baisse dans les deux milieux. Nous avons vérifié qu'il existe une diffusion de l'AMP et surtout du NAD du tissu aortique dans le milieu d'incubation qui augmente notablement sous l'influence de l'adrénaline. Ceci

est en accord avec la diminution significative du taux des nucléotides riches en énergie, observée après action de l'adrénaline et confirme la perte du noyau adénylique par ce tissu. Le milieu influence également la vitesse de marquage des différentes fractions phosphorylées : le phosphate intra-cellulaire, le phosphate total et le NAD sont plus rapidement marqués en milieu bicarbonate.

Dans les deux milieux (Tableau XXIV) l'adrénaline ralentit la vitesse de marquage du phosphate minéral et du phosphate intra-cellulaire. Ceci est en accord avec le fait que chez les traités le phosphate minéral sort plus rapidement qu'il n'entre. En revanche l'adrénaline augmente dans tous les cas la vitesse de marquage du phosphore total et du phosphore résiduel. En ce qui concerne les nucléotides adényliques, il ressort de nos résultats (Tableau XXIV) que les trois phosphates de l'ATP ont une vitesse de marquage très différente. Le premier groupe phosphorylé, correspondant au phosphate de l'AMP, n'est jamais marqué, dans le temps de l'expérience, alors que le second, correspond au phosphate β de l'ADP se marque beaucoup plus lentement que le phosphate terminal de l'ATP. Nous avons constaté qu'après 10 mn d'incubation le phosphate labile (phosphocréatine) n'est pas encore en équilibre avec le phosphate terminal de l'ATP. Chez les témoins la vitesse de marquage du phosphate intra-cellulaire augmente plus rapidement que celle des nucléotides ce qui signifie que la vitesse d'entrée du phosphate dans la cellule est plus élevée que la vitesse de renouvellement des nucléotides. Chez les traités, le phosphate intra-cellulaire se marque plus lentement que chez les témoins tandis que la vitesse de marquage des nucléotides est plus rapide. Ce fait est en relation avec l'entrée de phosphate observée chez les témoins et la sortie de phosphate observée chez les traités. Dans les deux milieux l'adrénaline augmente de façon significative la vitesse de renouvellement du phosphate labile, de l'ATP et de l'ADP. La diminution de leur taux sous l'influence de l'adrénaline est donc compensée en partie par

l'augmentation de leur vitesse de renouvellement. La vitesse d'incorporation du ^{32}P dans le NAD est lente et la resynthèse du NAD, dans les deux milieux, ne reprend qu'après deux minutes d'incubation. Il est vraisemblable que la perte du tissu aortique en NAD dans le milieu d'incubation stimule la resynthèse. Dans les deux milieux, l'adrénaline stimule également la vitesse de renouvellement du NAD. Comme le phosphate terminal de l'AMP (et donc le phosphate alpha de l'ATP) n'est jamais marqué après 10 minutes d'incubation, cela signifie que l'incorporation du ^{32}P dans le NAD se fait dans la partie nicotine amide mononucléotide de la molécule. Ce dernier point est en accord avec les observations de VULFIN et coll. (113) et de MORELIS et GAUTHERON (114) effectuées sur du muscle strié et lisse chez le Rat. Nos résultats d'ensemble sont analogues à ceux obtenus par GAUTHERON et MORELIS à partir du diaphragme chez le Rat (102) et plaident en faveur d'une unicité d'action de l'adrénaline sur le plan métabolique.

3) EFFETS DU REGIME ATHERUGENE.

L'ensemble des résultats dont l'analyse est développée dans le paragraphe 1 fait ressortir le faible rendement du métabolisme de l'aorte. D'autre part on sait depuis les travaux d'ANITSCHKOW (115) qu'un régime riche en cholestérol produit chez le Lapin une hypercholestérolémie et une infiltration lipidique des parois artérielles, du foie et de beaucoup d'autres organes. Si on soumet des Lapins à un régime hypercholestérolé à 1 % pendant 3 mois et demi, comme nous l'avons fait, la teneur en cholestérol de leur aorte passe de 3,6 g/kg de tissu frais (valeur normale) à 26,1 (116) ; de plus la teneur en cholestérol augmente parallèlement à l'accroissement des lésions d'athérosclérose (117). Ces faits nous ont conduit à rechercher dans le métabolisme de la paroi aortique la cause première de ces lésions. Nous avons déjà souligné (Cf 1) le rendement énergétique très faible de la dégradation du glucose par l'aorte. De fait, l'analyse

de l'évolution des nucléotides adényliques, composés qui représentent le capital énergétique d'un tissu, est en bon accord avec ce que laisse prévoir le mauvais rendement énergétique du métabolisme de la paroi aortique. Sous l'influence du régime athérogène toutes les fractions phosphorylées sont affectées. Au cours du premier mois on constate une légère augmentation du phosphate minéral et des esters phosphores des glucides puis leur taux baisse notablement. Après trois mois et demi toutes les fractions phosphorylées sont diminuées de façon très significative (Tableau XXVIII). La teneur en dérivés riches en énergie est diminuée dès le premier mois de traitement (Tableau XXIX) ; on constate que les esters labiles varient parallèlement à l'ATP et l'ADP. Ces phénomènes ne s'accompagnent pas d'une apparition d'AMP libre ou d'une accumulation de phosphate minéral, qui baisse au contraire notablement, et ne sont donc pas le reflet d'une simple hydrolyse de l'ATP et de l'ADP. On peut donc penser que chez les animaux traités la synthèse des dérivés riches en énergie est profondément modifiée. Il est intéressant de souligner que ces modifications précèdent l'apparition des lésions histologiques macroscopiques qui s'installent habituellement chez le Lapin entre la huitième et la onzième semaine de régime (17). De plus le rapport ATP/ADP déjà faible chez les témoins tombe à une valeur comprise entre 0,30 et 0,48 en fin de traitement selon la race considérée (Tableau XXX). Il faut noter que chez les animaux consanguins les effets produits par le régime apparaissent plus rapidement et sont plus marqués. Au niveau du tissu hépatique, les effets sont sensiblement parallèles. Après trois de traitement, les taux de phosphore résiduel et d'ATP sont diminués de façon significative (Tableaux XXXII et XXXIII) et le rapport ATP/ADP tombe de 0,98 à 0,80 (Tableau XXXIV). Ces données sont en accord avec celles d'ODUSHKO (118) et sont à rapprocher de celles obtenues par MANDEL (1) à partir d'aortes de bovidés jeunes et âgés.

L'adrénaline, injectée par voie intra-veineuse, produit chez les animaux soumis à un régime athérogène des effets du même type (TableauXXXI et figure 14) que chez les animaux normaux mais nettement plus marqués. Son action se traduit par une accumulation de phosphate minéral et un abaissement significatif du taux des nucléotides adényliques, mais le retour aux valeurs normales est beaucoup plus lent que chez les animaux normaux.

L'administration du régime athérogène permet de mettre en évidence une diminution significative de la vitesse de marquage des fractions phosphorylées ainsi que de la vitesse de renouvellement des nucléotides adényliques dans le tissu aortique. Ainsi le taux des composés riches en énergie est non seulement diminué, dans un tissu dont les possibilités de mise en réserve d'énergie sont déjà faibles mais leur vitesse de resynthèse est également affectée. Ce fait est à rapprocher des travaux de SAKAKI et coll. (119) qui trouvent une diminution de l'incorporation de ^{32}P dans l'ATP de l'aorte chez les Rats âgés. Cette constatation est confirmée par l'abaissement significatif du taux d'ARN dans l'aorte des animaux traités (Tableau XXXVIII). MANDEL (1) relève la même observation dans l'aorte de bovidés âgés. Or nous avons déjà évoqué en introduction l'hypothèse qui verrait dans l'athérome une lésion naturellement liée au vieillissement du tissu aortique.

La réduction importante du taux des nucléotides adényliques de l'aorte a également comme conséquence de conduire à une perturbation des processus de biosynthèse qui exigent la participation de l'ATP, ce dont témoigne la diminution de la biosynthèse des protéines et donc des enzymes (Tableaux XXV à XXVII) lié à la réduction des disponibilités en nucléotides riches en énergie. Cette donnée est en accord avec les observations de SUKHAREVA et coll. (120). En effet en plus de la chute importante du taux d'ATP nous avons pu constater un abaissement très marqué du taux de GTP dans la paroi aortique sous l'influence du régime athérogène.

Parallèlement on constate que l'effet du régime se traduit par une diminution progressive de la consommation d'oxygène dans le tissu aortique qui atteint 29 % en fin de traitement ; il en est de même dans le tissu hépatique au niveau duquel cette réduction est de l'ordre de 39 % (Tableau XXXIX). De plus le taux d'oxydation du pyruvate est également diminué de façon significative dans l'aorte et le foie des animaux traités (Tableau XXXX). Ainsi il ressort que l'administration prolongée d'un régime athérogène conduit à un abaissement de la respiration tissulaire et à une diminution des phosphorylations oxydatives de la paroi aortique. L'abaissement progressif du niveau énergétique lié à la diminution du taux des nucléotides adényliques, conduit à une réduction de la biosynthèse des protéines.

L'ensemble des données acquises nous a permis de vérifier et de confirmer l'hypothèse de MANDEL selon laquelle l'atteinte du métabolisme énergétique de la paroi aortique peut à elle seule déclencher les lésions initiales de l'athérome. Il est vraisemblable que tous les processus qui perturbent la respiration et la nutrition du tissu artériel, qui se réalise exclusivement par imbibition, entraînent une réduction du métabolisme énergétique, limitée à la seule glycolyse, avec les conséquences que nous avons démontrées. C'est précisément le cas du régime athérogène et de l'adrénaline. VIRCHOW avait assimilé intuitivement la lésion athéromateuse à une lésion asphyxique. Or l'infiltration lipidique au niveau de l'intima et de la média artérielles et la formation possible d'un film de fibrine au niveau de l'endothélium rendent compte de ce phénomène asphyxique, qui compromet l'apport en oxygène et déclenche l'hypoxie qui entraîne à son tour une augmentation de l'activité glycolytique, donc une baisse du rendement énergétique. L'injection d'adrénaline produit des effets analogues en créant une carence en oxygène par suite de la vaso-constriction artérielle qu'elle provoque. Dans

cette optique on pourrait donc considérer effectivement l'athérome comme une lésion naturelle induite par la diminution du rendement énergétique, déjà faible dans ce tissu, et donc liée au vieillissement de la paroi artérielle.

CONCLUSIONS GENERALES.

Il ressort de l'ensemble de nos résultats que le tissu aortique, pourvu d'un équipement enzymatique relativement réduit, possède un métabolisme à faible rendement. Il en résulte que dans les conditions normales, les réserves énergétiques de ce tissu sont inférieures à celles d'autres organes. Parmi les effets purement métaboliques de l'adrénaline au niveau de l'aorte, on relève une diminution marquée du taux des dérivés riches en énergie compensée en partie par l'augmentation de leur vitesse de renouvellement. L'administration d'un régime athérogène entraîne une diminution très marquée du métabolisme énergétique dans l'aorte dont les conséquences directes se traduisent par une réduction de la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - MANDEL (P.) - Arch. Sci. Med., (Torino), 1962, 113, 223.
- 2 - PANTESCU (V.), VIAUD (J.), FONTAINE (R.) et MANDEL (P.) - C.R. Soc. Biol., 1957, 151, 1584.
- 3 - SBARRA (A.J.), GILFILLAN (R.F.) et BARDAWIL (W.A.) - Biochem. Biophys., USA, 1960, 3, 311.
- 4 - BEACONSFIELD (P.) - Experientia, 1962, 18, 274.
- 5 - MANDEL (P.) et KEMPF (E.) - C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 791.
- 6 - MANDEL (P.) et KEMPF (E.) - C.R. Acad. Sci., (Paris), 1962, 255, 2315.
- 7 - MANDEL (P.) et KEMPF (E.) - J. Atheroscler. Res., 1963, 3, 233.
- 8 - NICROSINI (F.), RICOTTI (V.), PASOTTI (C.) et DEL FAVERO (A.) - Arch. Sci. Med., (Torino), 1963, 115, 192.
- 9 - NICROSINI (F.), RICOTTI (V.), DEL FAVERO (A.) et PASOTTI (C.) - Arch. Sci. Med., (Torino), 1963, 115, 199.
- 10 - MANDEL (P.) et KEMPF (E.) - Biochim. Biophys. Acta, 1961, 51, 184.
- 11 - MANDEL (P.), FONTAINE (R.) et PANTESCU (V.) - Biochim. Biophys. Acta, 1961, 49, 580.
- 12 - MANDEL (P.), PANTESCU (V.) et VIAUD (J.) - C.R. Acad. Sci., (Paris), 1958, 246, 2062.

- 13 - ZEMPLENYI (T.), MRHOVA (O.) et LOJDA (Z.) - J. Atheroscler. Res., 1963, 3, 50.
- 14 - MRHOVA (O.), ZEMPLENYI (T.) et LOJDA (Z.) - J. Atheroscler. Res., 1963, 3, 44.
- 15 - LEITES (F.L.) - Fed. Proc., 1964, 23, 565.
- 16 - BIERRING (F.) et KOBAYASI (T.) - Acta Path. Microbiol. Scand., 1963, 57, 154.
- 17 - PERRIN (A.), DELAHAYE (J.P.) et GUNIN (A.) - In "Actualités cardiovasculaires médico-chirurgicales, 1965, 2e série, Masson Ed.
- 18 - CHUN I WANG, STRAUSS (L.) et ADLERSBERG (D.) - Circulation, 1956, 14, 481.
- 19 - MYASNIKOV (A.L.), VIKHER (AM.) et KASATKINA (L.V.) - Malattie Cardio-vascolari, 1963, 4, 133.
- 20 - ANCLA (M.), DE BRUX (J.), CALVARIN (R.) et KAUFMANN (H.) - Agressologie, 1966, 7, 563.
- 21 - I.U.P.A.C. - I.U.B. - Biochem. J., 1966, 101, 1.
- 22 - ORG. MOND. SANTE, SERV. TECHN. - 1958, 4, 3.
- 23 - OUCHTERLONY (O.) - Acta Path. Microbiol. Scand., 1949, 26, 507.
- 24 - KREBS (H.A.) et HENSELEIT (K.) - Z. Physiol. Chem., 1932, 210, 33.
- 25 - POTTER (V.R.) et ELVEHJEM (C.A.) - J. Biol. Chem., 1936, 114, 495.
- 26 - KELLER (E.B.) et ZAMECNIK (P.C.) - J. Biol. Chem., 1956, 221, 45.
- 27 - FLEURY (P.) et EBERHARD (R.) - Ann. Biol. Clin., 1951, 9, 453.
- 28 - BLOEMENDAL (H.), BONT (W.S.) et BENEDETTI (E.L.) - Biochim. Biophys. Acta, 1964, 87, 177.

- 29 - LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (L.A.) et RANDALL (J.) - J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
- 30 - SIEKEVITZ (P.) - J. Biol. Chem., 1952, 195, 549.
- 31 - KREBS (H.A.) - Biochim. Biophys. Acta, 1950, 4, 249.
- 32 - HURYCH (J.) et CHVAPIL (M.) - Biochim. Biophys. Acta, 1962, 65, 170.
- 33 - PETERKOFISKY (B.) et PRUCKOP (D.J.) - Analyt. Biochem., 1962, 4, 400.
- 34 - TROLL (W.) et LINDSAY (J.) - J. Biol. Chem., 1955, 215, 655.
- 35 - SCHEIDEGGER (J.J.) - Int. Arch. Allergy, 1955, 7, 103.
- 36 - SCHMIDT (G.) et THANNHAUSER (J.) - J. Biol. Chem., 1945, 161, 83.
- 37 - SCHNEIDER (W.C.) - J. Biol. Chem., 1945, 161, 293.
- 38 - OGUR (M.) et ROSEN (G.) - Arch. Biochem., 1950, 25, 262.
- 39 - SLATER (T.F.) - Biochim. Biophys. Acta, 1958, 27, 201.
- 40 - ZALTA (J.P.) - Thèse Doct. Sci. (Paris), 1960.
- 41 - DISCHE (Z.) - In "The Nucleic Acids", Vol. 1., p. 285.
CHARGAFF (E.) et DAVIDSON (J.N.), Ed., Acad.
Press, (N.Y.), 1955.
- 42 - BURTON (K.) - Biochem. J., 1956, 62, 315.
- 43 - CERIOTTI (G.) - J. Biol. Chem., 1952, 198, 297.
- 44 - CERIOTTI (G.) - J. Biol. Chem., 1955, 214, 59.
- 45 - SOMOGYI (M.) - J. Biol. Chem., 1930, 86, 655.
- 46 - RUSS (G.) et MOKOTOFF (R.) - J. Biol. Chem., 1951, 190, 659.
- 47 - WEIL (W.B.) - Proc. Soc. exp. Biol., 1952, 80, 103.
- 48 - BOWLER (R.G.) - Biochem. J., 1944, 38, 385.

- 49 - CLAUSER (H.), VULFIN (P.) et EBOUE-BONIS (D.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 205.
- 50 - THRELFALL (C.J.) - Biochem. J., 1957, 65, 694.
- 51 - GAUTHERON (D.) - Thèse Doct. Sci., (Paris), 1957.
- 52 - EGGLESTON (L.V.) et HEMS (R.) - Biochem. J., 1952, 52, 156.
- 53 - KREBS (H.A.) et HEMS (R.) - Biochim. Biophys. Acta, 1953, 12, 172.
- 54 - HANES (C.S.) et ISHERWOOD (F.A.) - Nature, 1949, 164, 1107.
- 55 - BERENBLUM (I.) et CHAIN (E.) - Biochem. J., 1938, 32, 295.
- 56 - Mc ELROY (W.D.) et STREHLER (B.L.) - Arch. Biochem., 1949, 22, 420.
- 57 - STREHLER (B.L.) et TOTTER (J.R.) - Arch. Biochem. Biophys., 1952, 40, 28.
- 58 - UMBREIT (W.W.), BURRIS (R.H.) et STAUFFER (J.F.) - Manometric Techniques and Tissue Metabolism, BURGESS Publishing Co., Minneapolis, 1951, p. 119.
- 59 - WOLLEMAN (M.) et KDCSAR (L.) - J. Atheroscler. Res., 1964, 4, 367.
- 60 - FISKE (C.H.) et SUBBAROW (Y.) - J. Biol. Chem., 1925, 66, 375.
- 61 - GORNALL (A.G.), BARDWILL (C.J.) et DAVID (N.M.) - J. Biol. Chem., 1949, 177, 751.
- 62 - SLATER (E.C.) et CLELAND (K.W.) - Biochem. J., 1953, 53, 547.
- 63 - WEICHSELBAUM (T.A.) - Am. J. Clin. Path., Techni. suppl., 1946, 10, 40.
- 64 - LISON (L.) - Statistique appliquée à la Biologie expérimentale. GAUTHIER-VILLARS, Ed., Paris, 1958, p. 58.
- 65 - HOAGLAND (M.B.) - Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 288.

- 66 - HOAGLAND (M.B.), KELLER (E.B.) et ZAMECNIK (P.C.) - J. Biol. Chem., 1956, 218, 345.
- 67 - LIPMANN (F.), HULSMANN (W.C.), HARTMANN (G.), BOMAN (H.G.) et ACS (G.) - J. Cell. Comp. Physiol., 1959, 54, 75.
- 68 - HULSMANN (W.C.) et LIPMANN (F.) - Biochim. Biophys. Acta, 1960, 43, 123.
- 69 - ALLEN (E.H.), GLASSMAN (E.) et SCHWEET (R.S.) - J. Biol. Chem., 1960, 235, 1061.
- 70 - LICHSTEIN (H.C.) - J. Biol. Chem., 1956, 219, 27.
- 71 - SOKOLOFF (L.), KAUFMAN (S.) et GELBOIN (H.V.) - Biochim. Biophys. Acta, 1961, 52, 410.
- 72 - ROCHE (J.), MICHEL (R.) et KAMEI (T.) - Biochim. Biophys. Acta, 1962, 61, 647.
- 73 - PETERSON (E.A.) et GREENBERG (D.M.) - J. Biol. Chem., 1952, 194, 359.
- 74 - KIT (S.) et GREENBERG (D.M.) - J. Biol. Chem., 1952, 194, 377.
- 75 - ZAMECNIK (P.C.) et KELLER (E.B.) - J. Biol. Chem., 1954, 209, 337.
- 76 - PALADE (G.E.), SIEKEVITZ (P.) et CARU (L.G.) - In "Ciba Foundation Symp. Exocrine Pancreas", CHURCHILL Ed., (London), 1962, p. 23.
- 77 - MARKS (P.A.), BURKA (E.R.) et SCHLESSINGER (D.) - Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1962, 48, 148.
- 78 - GIERER (A.) - J. Mol. Biol., 1963, 6, 148.
- 79 - WARNER (J.R.), KNOFF (P.M.) et RICH (A.) - Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1963, 49, 122.
- 80 - SLAYTER (H.S.), WARNER (J.R.) RICH (A.) et HALL (C.E.) - J. Mol. Biol., 1963, 7, 652.

- 81 - MUNRO (A.J.), JACKSON (R.J.) et KORNER (A.) - Biochem. J., 1964, 92, 289.
- 82 - VALDIGUIE (P.), DOUSTE-BLAZY (L.) et LAVABRE (T.) - C.R. Soc. Biol., 1958, 152, 1590.
- 83 - VALDIGUIE (P.) et DOUSTE-BLAZY (L.) - Toulouse Med., 1959, 60, 204.
- 84 - LOHMAN (D.) - In : H PEETER, Protides of the biological fluids, Elsevier Ed., (Amsterdam), 1963, 10, 61.
- 85 - GERD (S.), GERGEY (J.), JAKAB (L.), SZEKELY (J.) et VIRAG (S.) - J. Atheroscler. Res., 1961, 1, 88.
- 86 - KIRK (J.E.), EFFERSØE (P.G.) et CHIANG (S.P.) - J. Geront., 1954, 9, 10.
- 87 - DI SABATO (G.) et CUMOLLI (R.) - Sperimentale, 1957, 107, 77.
- 88 - MAIER (N.) et HAIMOVICI (H.) - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1957, 95, 425.
- 89 - MAIER (N.) et HAIMOVICI (H.) - Amer. J. Physiol., 1958, 195, 476.
- 90 - CHATTOPADHYAY (D.P.) - Ann. Biochem. Exptl. Med., 1961, 21, 241.
- 91 - COSTA (A.), WEBER (G.) et ANTONINI (F.) - Arch. Vechi. anat. pat. med. clin., 1950, 14, 29.
- 92 - MICHELAZZI (L.) - Arch. Ital. Med. sper., 1948, 3, 43.
- 93 - HENDERSON (A.E.) et Mc DOUGALL (J.D.B.) - Biochem. J., 1956, 62, 517.
- 94 - LEHNINGER (A.L.) - In "the arterial wall, Ageing, Structure and Chemistry". WILLIAMS and WILKINS Ed., (Baltimore), 1959, p. 120.
- 95 - KIRK (J.E.), LAURSEN (T.J.S.) et SCHAUS (R.) - J. Geront., 1955, 10, 178.

- 96 - BRIGGS (F.N.), CHERNICK (S.) et CHAIKOFF (J.L.) - J. Biol. Chem., 1949, 179, 103.
- 97 - GAUTHERON (D.) et CLAUSER (H.) - Biochim. Biophys. Acta, 1956, 22, 123.
- 98 - GAUTHERON (D.) et CLAUSER (H.) - Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, 385.
- 99 - MATRAY (F.) et GAUTHERON (D.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 1127.
- 100 - VIDLAKOVA (M.) et KLEINZELLER (A.) - Physiol. Bohemoslov., 1963, 12, 202.
- 101 - FRIEDMANN (S.M.), SRETER (F.A.), NAKASHIMA (M.) et FRIEDMANN (C.L.) - Amer. J. Physiol., 1962, 203, 697.
- 102 - GAUTHERON (D.) et MORELIS (R.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 1923.
- 103 - MALYSHEVA (L.V.) - Fed. Proc., 1964, 23, 562.
- 104 - FISCHER (E.R.) et GELLER (J.H.) - Circulation Res., 1960, 8, 820.
- 105 - MANDEL (P.), POIREL (G.) et SIMARD-DUQUESNE (N.) - J. Atheroscl. Res., 1966, 6, 463.
- 106 - CHATTOPADHYAY (D.P.) - Ann. Biochem. Exptl. Med., 1962, 22, 77.
- 107 - MUNRO (A.F.), RIFKIND (B.M.), LIEBE SCHEUTZ (H.J.), CAMPBELL (R.S.F.) et HOWARD (B.R.) - J. Atheroscl. Res., 1961, 1, 296.
- 108 - BISHOP (J.O) et SCHWEET (R.S.) - Biochim. Biophys. Acta, 1961, 49, 235.
- 109 - FLORINI (J.R.) - Biochim. Biophys. Res. Communic., 1962, 8, 12
- 110 - CLAUSER (H.), GAUTHERON (D.) et VOLFIN (P.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 103.

- 111 - MATRAY (F.) et GAUTHERON (D.) - Acta Endocrinol., 1959, 32, 151.
- 112 - CHANCE (B.) et HESS (B.) - J. Biol. Chem., 1959, 234, 2413.
- 113 - VOLFIN (P.), EBOUE (D.) et CLAUSER (H.) - Nature, 1961, 192, 166.
- 114 - MORELIS (R.) et GAUTHERON (D.) - C. R. Acad. Sc., 1965, 260, 3476.
- 115 - ANITSCHKOW (N.) - in E. V. COWDRY ed., Arteriosclerosis : a survey of the problem, Mac Millan Cie N.Y., 1933.
- 116 - BEAUMONT (J.L.), GROSOGGEAT (Y.), RICHARD (J.L.) et CLAUDE (J.R.) - J. Atheroscler. Res., 1963, 3, 210.
- 117 - Mc MILLAN (G.C.), HURLICK (L.) et DUFF (G.L.) - Arch. Pathol., 1955, 59, 285.
- 118 - ODUSHKO (N.P.) - Bull. Exper. Biol. Med., 1967, 4, 53
- 119 - SAKAKI (T.), NAKATANI (M.) et NAKAMURA (M.) - Jap. Circul. J., 1965, 29, 1.
- 120 - SUKHAREVA (B.S.), PAVLOVA (P.F.) et ZAITSEV (V.F.) - Bull. Exper. Biol. Med., 1966, 62, 51.

TABLE DES MATIERES

	Pages
- Introduction.....	1
- Rappel histologique.....	5
- Liste des abréviations.....	10
Chapitre I : "Matériel et Techniques"	
- A. Produits.....	12
- B. Animaux.....	14
- C. Traitements.....	14
- D. Dissection.....	16
- E. Homogénéisation.....	17
- F. Détermination de la biosynthèse des protéines in vitro	17
- 1) Incubations avec les aortes.....	17
- 2) Préparation d'enzyme pH 5 et de microsomes.....	18
- 3) Incubations avec les surnageants à 5.000 g.....	20
- 4) Incubations avec le système enzyme pH 5 - micro-	
somes.....	22
- 5) Incorporation de ¹⁴ C leucine dans les protéines	
ribosomales du foie.....	22
- 6) Incorporation de ¹⁴ C proline dans le collagène.	23
- 7) Analyse électrophorétique et immunoélectropho-	
rétique des protéines solubles de l'aorte	
humaine.....	25
- G. Dosage des acides nucléiques.....	26
- 1) Protocole d'isolement.....	26
- 2) Dosage d'ARN.....	28
- 3) Dosage d'ADN.....	30
- H. Mesure de l'Espace Extra Cellulaire.....	33
- 1) Méthode à l'inuline in vitro.....	33
- 2) Méthode au thiocyanate in vivo.....	36
- 3) Méthode au phosphate radio-actif.....	37
- I. Isolement et dosage des Nucléotides.....	38
-a) Préparation de l'extrait.....	38
-b) Adsorption et élution sur colonne.....	39

- c) Chromatographie sur papier.....	40
- d) Dosage.....	41
- e) Dosage d'ATP par luminescence.....	45
- J. Mesure de la vitesse de renouvellement des fractions phosphorylées de l'aorte.....	47
- a) Incubations.....	48
- b) Evaluation de l'activité spécifique.....	49
- K. Mesures manométriques.....	52
- 1) Mesures de la consommation d'oxygène.....	52
- 2) Mesures des rapports P/O.....	53
- L. Calculs statistiques.....	57

Chapitre II : "Etude de la biosynthèse des protéines dans le tissu aortique

- 1. Action de certains effecteurs.....	62
- 2. Incorporation d'acides aminés marqués dans les protéines des tissus aortique et hépatique.....	65
- a) Systèmes cellulaires.....	66
- b) Systèmes acellulaires.....	67
- c) Activité incorporatrice de ribosomes de foie.....	72
- d) Incorporation de ¹⁴ C proline dans le collagène...	74
- 3. Etude des fractions protéiques solubles de l'aorte humaine.....	76
- a) Identification des fractions.....	78
- b) Etude des fractions des aortes normales et athé- roscléreuses.....	81

Chapitre III : "Etude du métabolisme énergétique"

- 1. Répartition des fractions phosphorylées.....	85
tissu aortique.....	85
tissu hépatique.....	88
- 2. Métabolisme oxydatif de l'aorte.....	89
- a) Teneurs en ADN et ARN.....	91
- b) Capacité oxydative de coupes d'aortes.....	93
- c) Oxydation du pyruvate et du succinate : Rapports P/O.....	96

Chapitre IV : "Influence de l'adrénaline sur les composés phosphorylés du tissu aortique"

- A. Evolution des nucléotides adényliques et des fractions phosphorylées.....	99
- 1. Effets d'une injection unique d'adrénaline.....	100
- 2. Effets d'injections répétées.....	103
- 3. Effets produits par une seule injection.....	103
- B. Influence de l'adrénaline sur la vitesse d'incorporation du ^{32}P dans les fractions phosphorylées de l'aorte.....	106
- 1. Evolution de la Radio-activité dans le sang.....	106
- 2. Influence de l'adrénaline sur le volume de l'E.E.C.....	108
- 3. Influence de l'adrénaline sur l'activité spécifique des fractions phosphorylées de l'aorte	113
- a) Cinétique d'évolution.....	115
- b) Vitesse d'incorporation du ^{32}P	118
- c) Vitesse de renouvellement des fractions phosphorylées.....	121

Chapitre V : "Influence du régime athérogène sur le métabolisme aortique"

- 1. Effets du régime sur la biosynthèse des protéines	128
- 2. Effets du régime sur les fractions phosphorylées de l'aorte et du foie.....	131
- A. Tissu aortique	
- a) évolution des fractions phosphorylées.....	131
- b) évolution des nucléotides.....	133
- c) rapport ATP/ADP.....	135
- d) influence de l'adrénaline sur les fractions phosphorylées.....	135
- B. Tissu hépatique	
- a) évolution des fractions phosphorylées.....	140
- b) évolution des nucléotides adényliques....	140
- c) évolution des nucléotides non adényliques	143

- 3. Effets du régime sur l'activité spécifique des fractions phosphorylées de l'aorte.....	144
- a) Variation de la valeur de l'E.E.C.....	144
- b) Cinétique d'évolution des fractions phosphorylées.....	146
- c) Vitesse de renouvellement.....	146
- 4. Effets du régime sur le métabolisme oxydatif de l'aorte.....	151
- a) Teneurs en ADN et ARN après 3 mois de régime	151
- b) Consommation d'oxygène.....	153
- c) Rapports P/O.....	155
- Résumé : "Conclusions".....	157
- Discussion.....	163
- Bibliographie.....	181
- Table des Matières.....	189

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

METABOLISME DU MUSCLE CARDIAQUE NORMAL ET ANOXIQUE

Vu :

Les membres du Jury

J. CHOPIN

D. GAUTHERON

H. CLAUSER

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences

J. BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :

LYON le 12 décembre 1967

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université

P. LOUIS

